(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191081 (13) A1

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
**2021.07.09**

(22) Дата подачи заявки
**2019.10.18**

(51) Int. Cl. ***A61K 38/04*** (2006.01)
***A61K 39/21*** (2006.01)
***C07K 7/04*** (2006.01)

## (54) НОВЫЕ РАКОВЫЕ АНТИГЕНЫ И СОПУТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

(31) **18201634.5**
(32) **2018.10.19**
(33) **EP**
(86) **PCT/GB2019/052980**
(87) **WO 2020/079448 2020.04.23**

(71) Заявитель:
**ДЗЕ ФРЭНСИЗ КРИК ИНСТИТЬЮТ ЛИМИТЕД; ЭНАРА БИО ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Кассиотис Джордж, Янг Джордж, Аттиг Ян, Снейдерс Брам, Перкинс Дэвид, Марино Фабио, Тернетт Никола (GB)**

(74) Представитель:
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Среди прочего, описаны полипептиды и нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные полипептиды, которые применимы в лечении, профилактике и диагностировании злокачественного новообразования, в частности меланомы, особенно меланомы кожи и увеальной меланомы.

202191081 A1

202191081 A1

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567456EA/011

## НОВЫЕ РАКОВЫЕ АНТИГЕНЫ И СОПУТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антигенным полипептидам и соответствующим полинуклеотидам для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования, в частности, для применения в лечении или профилактике меланомы (например, меланомы кожи или увеальной меланомы). Настоящее изобретение также относится, среди прочего, к фармацевтическим и иммуногенным композициям, содержащим указанные нуклеиновые кислоты и полипептиды, иммунные клетки, нагруженные указанными полипептидами и полинуклеотидами и/или стимулируемыми указанными полипептидами и полинуклеотидами, антителами, специфическими для указанных полипептидов, и клеток (аутологичных или другим образом), полученным с помощью генной инженерии с использованием молекул, которые распознают указанные полипептиды.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В рамках нормального иммунного надзора за патогенными микробами внутриклеточные белки подвергаются деградации всеми клетками с образованием пептидов, которые загружаются в молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, которые экспрессируются на поверхности всех клеток. Большинство этих пептидов, полученных из клетки-хозяина, распознаются как собственные и остаются невидимыми для адаптивной иммунной системы. Однако чужеродные (не своим) пептиды способны стимулировать экспансию наивных CD8+ Т-клеток, которые кодируют Т-клеточный рецептор (ТКР), который прочно связывает комплекс ГКГС I-пептид. Эта размноженная популяция Т-клеток может продуцировать эффекторные CD8+ Т-клетки (включая цитотоксические Т-лимфоциты - ЦТЛ), которые могут элиминировать меченные чужеродным антигеном клетки, а также CD8+ Т-клетки памяти, которые могут быть повторно амплифицированы, когда меченные чужеродным антигеном клетки появляются позже в жизни животного.

Молекулы ГКГС класса II, экспрессия которых, как правило, ограничивается профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК), такими как дендритные клетки (ДК), как правило, загружены пептидами, которые были интернализованы из экзогенной среды. Связывание комплементарного ТКР от наивной CD4+ Т-клетки с комплексом ГКГС II-пептид в присутствии различных факторов, включая молекулы Т-клеточной адгезии (CD54, CD48) и костимулирующие молекулы (CD40, CD80, CD86), вызывает созревание CD4+ Т-клеток в эффекторные клетки (например, $T_H1$, $T_H2$-, $T_H17$-, $T_{FH}$-, регуляторные Т-клетки). Эти эффекторные CD4+ Т-клетки могут способствовать дифференцировке В-клеток в секретирующие антитела плазматические клетки, а также способствовать дифференцировке антигенспецифических CD8+ ЦТЛ, тем самым помогая индуцировать адаптивный иммунный ответ на чужеродные антигены, которые включают

как краткосрочные эффекторные функции и долговременная иммунологическая память. ДК могут выполнять процесс перекрестной презентации пептидных антигенов путем доставки экзогенных антигенов (таких как пептид или белок, высвобождаемый патогеном или опухолевой клеткой) на свои молекулы ГКГС I, способствуя генерации иммунологической памяти путем обеспечения альтернативного пути стимуляции экспансии наивных CD8+ Т-клеток.

Иммунологическая память (в частности, антигенспецифические В-клетки/антитела и антигенспецифические ЦТЛ) являются критически важными участниками в борьбе с микробными инфекциями, а иммунологическую память использовали для разработки многочисленных вакцин, которые предотвращают заболевания, вызванные важными патогенными микробами. Также известно, что иммунологическая память играет ключевую роль в контроле образования опухолей, но было разработано очень мало эффективных противораковых вакцин.

Злокачественное новообразование является второй по значимости причиной заболеваемости, на его долю приходится почти 1 из 6 всех смертей в мире. Из 8,8 миллиона случаев смерти, вызванных раком в 2015 году, больше всего жизней унесли рак легкого (1,69 миллиона), рак печени (788000), колоректальный рак (774000), рак желудка (754 000) и рак груди (571000). Экономический ущерб от злокачественных новообразований в 2010 году оценивается в 1,16 триллиона долларов США, и ожидается, что число новых случаев вырастет примерно на 70% в течение следующих двух десятилетий (Факты о раке Всемирной Организации Здравоохранения, 2017).

Современные способы лечения меланомы кожи разнообразны и в значительной степени зависят от локализации опухоли и стадии заболевания. Основным способом лечения неметастатической меланомы является хирургическое удаление опухоли и окружающих тканей. Для меланом на более поздних стадиях может потребоваться лечение, включающее иссечение лимфатических узлов, лучевую терапию или химиотерапию. Стратегии блокады иммунных контрольных точек, включая применение антител, нацеленных на негативные иммунные регуляторы, такие как PD-1/PD-L1 и CTLA4, недавно произвели революцию в лечении различных злокачественных новообразований, включая меланому (Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018) Science, 359:1350-1355.). Необычайная ценность способов лечения при помощи блокады контрольных точек и общеизвестная связь их клинической пользы с адаптивными иммунными ответами пациента (в частности, Т-клеточными иммунными ответами) на их собственные раковые антигены вновь активизировали поиск эффективных противораковых вакцин и способов вакцинации и антигенов противораковых вакцин.

Эндогенные ретровирусы человека (HERV) представляют собой остатки древних интеграций экзогенных инфекционных ретровирусов в клетках зародышевой линии. HERV принадлежат к группе эндогенных ретроэлементов, которые характеризуются наличием длинных концевых повторов (ДКП), фланкирующих вирусный геном. Эта группа также включает различимые ДКП-ретротранспозоны млекопитающих (MaLR) и

поэтому все вместе они известны как ДКП-элементы (совокупно называемые в данном документе как ERV для обозначения всех ДКП-элементов). ERV составляют значительную часть генома млекопитающих (8%) и могут быть сгруппированы примерно в 100 семейств на основе гомологии последовательностей. Многие последовательности ERV кодируют дефектные провирусы, которые разделяют прототипную ретровирусную геномную структуру, состоящую из генов gag, pro, pol и env, фланкированных ДКП. Некоторые интактные ОРС ERV продуцируют ретровирусные белки, которые имеют общие черты с белками, кодируемыми экзогенными инфекционными ретровирусами, такими как ВИЧ-1. Такие белки могут служить антигенами для индукции мощного иммунного ответа (Hurst & Magiorkinis, 2015, J. Gen. Virol 96:1207-1218), что позволяет предположить, что полипептиды, кодируемые ERV, могут избегать процессов селекции Т- и В-клеточных рецепторов и центральной и периферической толерантности. Иммунная реактивность к продуктам ERV может возникать спонтанно при инфекции или злокачественном новообразовании, а продукты ERV считаются причиной некоторых аутоиммунных заболеваний (Kassiotis & Stoye, 2016, Nat. Rev. Immunol. 16:207-219).

Из-за накопления мутаций и рекомбинационных событий в процессе эволюции большинство последовательностей, полученных из ERV, утратили функциональные открытые рамки считывания для некоторых или всех своих генов и, следовательно, свою способность продуцировать инфекционный вирус. Однако эти элементы ERV поддерживаются в ДНК зародышевой линии, как и другие гены, и по-прежнему обладают потенциалом продуцировать белки по меньшей мере из некоторых из их генов. Действительно, белки, кодируемые HERV, были обнаружены при различных злокачественных новообразованиях у человека. Например, сплайс-варианты гена env HERV-K, Rec и Np9, обнаруживаются исключительно в злокачественных первичных половых клетках яичка, а не в здоровых клетках (Ruprecht et. al, 2008, Cell Mol Life Sci 65:3366-3382). Повышенные уровни транскриптов HERV также наблюдались при злокачественных новообразованиях, например, раке предстательной железы, по сравнению со здоровыми тканями (Wang-Johanning, 2003, Cancer 98:187-197; Andersson et al., 1998, Int. J. Oncol, 12:309-313). Кроме того, было показано, что сверхэкспрессия HERV-E и HERV-H оказывает иммуносупрессивное действие, что также может способствовать развитию злокачественного новообразования (Mangeney et al., 2001, J. Gen. Virol. 82:2515-2518). Однако точный механизм(-ы), посредством которых HERV могут способствовать развитию или патогенности злокачественного новообразования, остается неизвестным.

В дополнение к дерегулированию экспрессии окружающих соседних генов-хозяев, активность и транспозиция регуляторных элементов ERV в новые геномные сайты может привести к продукции новых транскриптов, некоторые из которых могут обладать онкогенными свойствами (Babaian & Mager, Mob. DNA, 2016, , Lock et al., PNAS, 2014, 111:3534-3543).

Известен широкий спектр способов вакцинации. Один хорошо описанный подход

включает прямую доставку антигенного полипептида субъекту с целью формирования иммунного ответа (включая B- и T-клеточные ответы) и стимуляции иммунологической памяти. Альтернативно, полинуклеотид можно вводить субъекту с помощью вектора, так что кодируемый полинуклеотидом иммуногенный полипептид экспрессируется in vivo. Использование вирусных векторов, например, аденовирусных векторов, хорошо изучено для доставки антигенов как в профилактической вакцинации, так и в стратегиях терапевтического лечения злокачественного новообразования (Wold et al. Current Gene Therapy, 2013, Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy, 13:421-433). Иммуногенные пептиды, полипептиды или кодирующие их полинуклеотиды также можно использовать для загрузки полученных от пациента антигенпрезентирующих клеток (АПК), которые затем можно вводить субъекту в качестве вакцины, вызывающей терапевтический или профилактический иммунный ответ. Примером такого подхода является Provenge, которая в настоящее время является единственной противораковой вакциной, одобренной FDA.

Раковые антигены также можно использовать для лечения и профилактики злокачественного новообразования, используя их для создания множества невакцинных терапевтических способов. Эти способы лечения делятся на два разных класса: 1) антигенсвязывающие биопрепараты, 2) адоптивные клеточные терапии.

Антигенсвязывающие биопрепараты, как правило, состоят из поливалентных сконструированных полипептидов, которые распознают раковые клетки, несущие антиген, и способствуют их разрушению. Антигенсвязывающие компоненты этих биопрепаратов могут состоять из биопрепаратов на основе ТКР, включая, помимо прочего, ТКР, высокоаффинные ТКР и миметики ТКР, полученные с помощью различных технологий (в том числе основанных на технологиях моноклональных антител). Цитолитические фрагменты этих типов поливалентных биопрепаратов могут состоять из цитотоксических химических веществ, биологических токсинов, нацеливающих мотивов и/или иммуностимулирующих мотивов, которые облегчают нацеливание и активацию иммунных клеток, любой из которых способствует терапевтическому разрушению опухолевых клеток.

Адоптивная клеточная терапия может быть основана на собственных Т-клетках пациента, которые выделяют и стимулируют ex vivo препаратами на основе вакцинных антигенов (культивируются с Т-клетками в присутствии или в отсутствие других факторов, включая клеточные и бесклеточные компоненты) (JCI Insight. 2018 Oct 4;3(19). pii: 122467. doi: 10.1172/jci.insight.122467). Альтернативно, адоптивная клеточная терапия может быть основана на клетках (включая клетки, полученные или не полученные от пациента), которые были специально сконструированы для экспрессии антигенсвязывающих полипептидов, распознающих раковые антигены. Эти антигенсвязывающие полипептиды относятся к тем же классам, что и описанные выше для антигенсвязывающих биопрепаратов. Таким образом, лимфоциты (аутологичные или неаутологичные), которые были генетически модифицированы для экспрессии раковых

антигенсвязывающих полипептидов, могут быть введены пациенту в виде адоптивной клеточной терапии для лечения их злокачественного новообразования.

Применение антигенов ERV для повышения эффективного иммунного ответа на злокачественное новообразование продемонстрировало многообещающие результаты в способствовании регрессии опухоли и более благоприятному прогнозу на мышиных моделях злокачественного новообразования (Kershaw et al., 2001, Cancer Res. 61:7920-7924; Slansky et al., 2000, Immunity 13:529-538). Таким образом, были запланированы исследования антиген-ориентированной иммунотерапии HERV с участием людей (Sacha et al., 2012, J. Immunol 189:1467-1479), хотя прогресс был ограничен, отчасти из-за серьезного ограничения идентифицированных опухолеспецифических антигенов ERV.

В WO 2005/099750 идентифицированы заякоренные последовательности в существующих вакцинах против инфекционных патогенов, которые, как правило, формируют перекрестно-реактивные иммунные ответы против опухолевого антигена HERV-K Mel и обеспечивают защиту от меланомы.

WO 00/06598 относится к идентификации связанных с опухолью генов HERV-AVL3-B, которые предпочтительно экспрессируются в меланомах, а также к способам и продуктам для диагностирования и лечения патологических состояний, характеризующихся экспрессией указанных генов.

В WO 2006/119527 предложены антигенные полипептиды, полученные из ассоциированного с меланомой эндогенного ретровируса (МАЭВ), и их применение для обнаружения и диагностирования меланомы, а также прогноза заболевания. Также раскрыто применение антигенных полипептидов в качестве противораковых вакцин.

В WO 2007/137279 описаны способы и композиции для обнаружения, предотвращения и лечения HERV-K+ злокачественных новообразований, например, с применением антитела, связывающего HERV-K+, для предотвращения или ингибирования пролиферации раковых клеток.

В WO 2006/103562 описан способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, при котором экспрессируется иммуносупрессивный белок Np9 из гена env HERV-K. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим нуклеиновую кислоту или антитела, способные ингибировать активность указанного белка, или к иммуногену, или вакцинной композиции, способной вызывать иммунный ответ, направленный против указанного белка.

В WO 2007/109583 предложены композиции и способы профилактики или лечения неопластического заболевания у млекопитающего путем обеспечения композиции, содержащей обогащенную популяцию иммунных клеток, реактивных к антигену HERV-E на опухолевой клетке.

В Humer J, et al., 2006, Canc. Res., 66:1658-63 идентифицирован маркер меланомы, полученный из ассоциированных с меланомой эндогенных ретровирусов.

Существует необходимость в идентификации дополнительных HERV-ассоциированных антигенных последовательностей, которые можно использовать в

иммунотерапии злокачественного новообразования, в частности, меланомы, более предпочтительно меланомы кожи и увеальной меланомы.

**СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Авторы неожиданно открыли, что определенные РНК-транскрипты, которые содержат ДКП-элементы или которые получены из геномных последовательностей, примыкающих к тканевым ДКП-элементам, обнаруживаются на высоких уровнях в клетках меланомы кожи, но не обнаруживаются или обнаруживаются на очень низких уровнях в нормальных, здоровых тканях (см. Пример 1). Такие транскрипты в данном документе называются специфическими для злокачественного новообразования транскриптами, охватывающими ДКП-элемент (CLT). Кроме того, изобретатели показали, что подмножество потенциальных полипептидных последовательностей (то есть открытых рамок считывания (ОРС)), кодируемых этими CLT, транслируется в раковых клетках, процессируется компонентами аппарата процессинга антигена и презентуется на поверхности клеток, обнаруживаемых в опухолевой ткани в ассоциации с молекулами главного комплекса гистосовместимости классов I и II (ГКГС класса I и ГКГС класса II) и человеческих лейкоцитарных антигенов классов I и II (HLA класса I, HLA класса II) (см. Пример 2 ). Эти данные демонстрируют, что эти полипептиды (называемые в данном документе CLT-антигенами) фактически являются антигенными. Таким образом, ожидается, что презентация раковых клеток CLT-антигенов сделает эти клетки восприимчивыми к элиминации Т-клетками, несущими родственные Т-клеточные рецепторы (ТКР) для CLT-антигенов, и способы/схемы вакцинации на основе CLT-антигенов, которые амплифицируют Т-клетки, несущие эти родственные ТКР, как ожидается, будут вызывать иммунные ответы против раковых клеток (и опухолей, содержащих их), особенно меланомы, особенно меланомных опухолях кожи. Т-клетки от субъектов с меланомой действительно реактивны к пептидам, полученным из CLT-антигенов, описанных в данном документе, и амплифицируют Т-клетки и амплифицируют последовательности Т-клеточных рецепторов (см. Пример 3). Авторы изобретения подтвердили, что Т-клетки, специфические в отношении CLT-антигенов, не были удалены из репертуара Т-клеток здорового субъекта из-за центральной толерантности (см. Пример 4). Определяли присутствие и уничтожающую активность CLT-антиген-специфических Т-клеток в культурах ex vivo Т-клеток здорового донора (см. Пример 5). Наконец, исследования методом количественной ПЦР-РВ подтвердили, что CLT специфически экспрессируются в РНК, экстрагированной из линий меланомных клеток, по сравнению с линиями немеланомных клеток (см. Пример 7).

Авторы изобретения также неожиданно обнаружили, что некоторые CLT, кодирующие CLT-антиген, а также сверхэкспрессируемые при меланоме кожи, также сверхэкспрессируются в увеальной меланоме. Предполагается, что полипептидные последовательности CLT-антигена, кодируемые этими CLT, будут вызывать иммунные ответы против клеток увеальной меланомы и опухолей, содержащих их.

CLT и CLT-антигены, которые являются предметом настоящего изобретения, не

являются каноническими последовательностями, которые могут быть легко получены из известных последовательностей генома опухоли, обнаруженных в Атласе ракового генома. CLT представляют собой транскрипты, возникающие в результате сложных событий транскрипции и сплайсинга, управляемых последовательностями регуляции транскрипции, которые происходят из ЭРВ. Поскольку CLT экспрессируются на высоком уровне и поскольку последовательности полипептидов CLT-антигена не являются последовательностями белков здорового человека, ожидается, что они будут способны вызывать сильные специфические иммунные ответы (как действительно было установлено - см. Примеры 3-5). и, таким образом, подходят для терапевтического применения в условиях иммунотерапии злокачественного новообразования.

CLT-антигены, обнаруженные в высокоэкспрессируемых транскриптах, характеризующих опухолевые клетки, о существовании которых до настоящего изобретения не было известно и которые продуцируют белковые продукты у человека и стимулируют иммунные ответы, можно использовать в нескольких форматах. Во-первых, полипептиды CLT-антигена по изобретению могут быть непосредственно доставлены субъекту в виде вакцины, которая вызывает терапевтический или профилактический иммунный ответ на опухолевые клетки. Во-вторых, нуклеиновые кислоты по изобретению, которые могут быть оптимизированы по кодонам для усиления экспрессии кодируемых ими антигенов CLT, могут вводиться непосредственно или же вставляться в векторы для доставки in vivo с целью продуцирования кодируемых белковых продуктов у субъекта в качестве вакцины, которая вызывает терапевтический или профилактический иммунный ответ на опухолевые клетки. В-третьих, полинуклеотиды и/или полипептиды по изобретению можно использовать для загрузки полученных от пациента антигенпрезентирующих клеток (АПК), которые затем могут быть введены субъекту в качестве вакцины, вызывающей терапевтический или профилактический иммунный ответ на опухолевые клетки. В-четвертых, полинуклеотиды и/или полипептиды по изобретению можно использовать для стимуляции ex vivo Т-клеток субъекта, получая препарат стимулированных Т-клеток, который можно вводить субъекту в качестве терапии для лечения злокачественнного новообразования. В-пятых, биологические молекулы, такие как Т-клеточные рецепторы (ТКР) или миметики ТКР, которые распознают CLT-антигены, которые образуют комплекс с молекулами ГКГС I, и дополнительно модифицированные, чтобы позволить им уничтожать (или способствовать уничтожению) раковые клетки, можно вводить субъекту в виде терапии для лечения злокачественного новообразования. В-шестых, химерные версии биологических молекул, которые распознают CLT-антигены, которые образуют комплекс с ГКГС клеток, могут быть введены в Т-клетки (аутологичные или неаутологичные), а полученные клетки можно вводить субъекту в качестве терапии для лечения злокачественного новообразования. Эти и другие применения более подробно описаны ниже.

Таким образом, изобретение обеспечивает, среди прочего, выделенный полипептид, содержащий последовательность, выбранную из:

последовательности любой з SEQ ID NO: 1-10 и

варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательностей из (a)

(далее упоминается как «полипептид по изобретению»).

Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид по изобретению (далее упоминается как «нуклеиновая кислота по изобретению»).

Полипептиды по изобретению и нуклеиновые кислоты по изобретению, а также связанные с ними аспекты изобретения, как ожидается, будут полезны в ряде вариантов осуществления в иммунотерапии и профилактике злокачественного новообразования, в частности, в иммунотерапии и профилактике меланомы, как обсуждается более подробно ниже.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Для каждой из Фиг. 1-15 на верхней панели показан выделенный спектр МС/МС (с назначенными ионами фрагментов) пептида, выделенного из образца опухоли пациента, а на нижней панели показана визуализация спектра, демонстрирующая положения линейных пептидных последовательностей, которые были сопоставлены с ионами фрагментов.

Фиг. 1. Спектры пептида SEQ ID NO: 11, выделенного из образца опухоли пациента Mel-3.

Фиг. 2. Спектры пептида SEQ ID NO: 12, выделенного из образца опухоли пациента Mel-3.

Фиг. 3. Спектры пептида SEQ ID NO: 13, выделенного из образца опухоли пациента Mel-5.

Фиг. 4. Спектры пептида SEQ ID NO: 13, выделенного из образца опухоли пациента Mel-16.

Фиг. 5. Спектры пептида SEQ ID NO: 15, выделенного из образца опухоли пациента Mel-26.

Фиг. 6. Спектры пептида SEQ ID NO: 16, выделенного из образца опухоли пациента Mel-20.

Фиг. 7. Спектры пептида SEQ ID NO: 17, выделенного из образца опухоли пациента Mel-35.

Фиг. 8. Спектры пептида SEQ ID NO: 19, выделенного из образца опухоли пациента Mel-3.

Фиг. 9. Спектры пептида SEQ ID NO: 21, выделенного из образца опухоли пациента Mel-27.

Фиг. 10. Спектры пептида SEQ ID NO: 20, выделенного из образца опухоли пациента Mel-27.

Фиг. 11. Спектры пептида SEQ ID NO: 22, выделенного из образца опухоли пациента Mel-27.

Фиг. 12. Спектры пептида SEQ ID NO: 23, выделенного из образца опухоли пациента Mel-27.

Фиг. 13. Спектры пептида SEQ ID NO: 24, выделенного из образца опухоли пациента Mel-27.

Фиг. 14. Спектры пептида SEQ ID NO: 25, выделенного из образца опухоли пациента Mel-16.

Фиг. 15. Спектры пептида SEQ ID NO: 26, выделенного из образца опухоли пациента Mel-41.

На Фиг. 16 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-15, соотносимого с SEQ ID NO: 27.

На Фиг. 17 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-10, соотносимого с SEQ ID NO: 29.

На Фиг. 18 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-5, соотносимого с SEQ ID NO: 14.

На Фиг. 19 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-4, соотносимого с SEQ ID NO: 21.

На Фиг. 20 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-18, соотносимого с SEQ ID NO: 31.

На Фиг. 21 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-16, соотносимого с SEQ ID NO: 13.

На Фиг. 22 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-3, соотносимого с SEQ ID NO: 19.

На Фиг. 23 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-6, соотносимого с SEQ ID NO: 28.

На Фиг. 24 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-18, соотносимого с SEQ ID NO: 18.

На Фиг. 25 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-4, соотносимого с SEQ ID NO: 30.

На Фиг. 26 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-4, соотносимого с SEQ ID NO: 20.

На Фиг. 27 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-20, соотносимого с SEQ ID NO: 16.

На Фиг. 28 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента Mel-3, соотносимого с SEQ ID NO: 12.

Для каждой из Фиг. 29-42 на верхней панели показан выделенный спектр МС/МС (с назначенными ионами фрагментов) пептида, выделенного из образца опухоли пациента, а на нижней панели показана визуализация спектра, демонстрирующая положения линейных пептидных последовательностей, которые были сопоставлены с ионами фрагментов.

Фиг. 29. Спектры пептида SEQ ID NO: 51, выделенного из образца опухоли

пациента Mel-40.

Фиг. 30. Спектры пептида SEQ ID NO: 51, выделенного из образца опухоли пациента Mel-41.

Фиг. 31. Спектры пептида SEQ ID NO: 52, выделенного из образца опухоли пациента Mel-27.

Фиг. 32. Спектры пептида SEQ ID NO: 52, выделенного из образца опухоли пациента Mel-39.

Фиг. 33. Спектры пептида SEQ ID NO: 13, выделенного из образца опухоли пациента 2MT3.

Фиг. 34. Спектры пептида SEQ ID NO: 13, выделенного из образца опухоли пациента 2MT10.

Фиг. 35. Спектры пептида SEQ ID NO: 12, выделенного из образца опухоли пациента 2MT3.

Фиг. 36. Спектры пептида SEQ ID NO: 16, выделенного из образца опухоли пациента 2MT4.

Фиг. 37. Спектры пептида SEQ ID NO: 17, выделенного из образца опухоли пациента 2MT3.

Фиг. 38. Спектры пептида SEQ ID NO: 53, выделенного из образца опухоли пациента 1MT1.

Фиг. 39. Спектры пептида SEQ ID NO: 51, выделенного из образца опухоли пациента 2MT3.

Фиг. 40. Спектры пептида SEQ ID NO: 19, выделенного из образца опухоли пациента 2MT3.

Фиг. 41. Спектры пептида SEQ ID NO: 19, выделенного из образца опухоли пациента 2MT1.

Фиг. 42. Спектры пептида SEQ ID NO: 54, выделенного из образца опухоли пациента 2MT12.

На каждой из Фиг. 43-50 показано выравнивание нативного спектра МС/МС пептида, выделенного из образца опухоли пациента (вверху), с нативным спектром синтетического пептида, соответствующего той же последовательности (внизу).

На Фиг. 43 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента 2MT3, соотносимого с SEQ ID NO: 13.

На Фиг. 44 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента 2MT3, соотносимого с SEQ ID NO: 12.

На Фиг. 45 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента 2MT4, соотносимого с SEQ ID NO: 16.

На Фиг. 46 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента 2MT3, соотносимого с SEQ ID NO: 17.

На Фиг. 47 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента 1MT1, соотносимого с SEQ ID NO: 53.

На Фиг. 48 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента 2MT3, соотносимого с SEQ ID NO: 51.

На Фиг. 49 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента 2MT3, соотносимого с SEQ ID NO: 19.

На Фиг. 50 показан масс-спектр пептидного фрагмента из иммунопептидомного анализа пациента 2MT12, соотносимого с SEQ ID NO: 54.

На панелях A-C Фиг. 51 показана амплификация опухолевых антигенспецифических Т-клеток из культур МКПК пациентов в ответ на культивирование со специфическими пептидами, полученными из опухолевого

антигена.

На панелях A-D Фиг. 52 представлены сводные данные о пептидах, полученных от CLT-антигена (SEQ ID NO: 55 - SEQ ID NO: 72), которые были способны амплифицировать несущие специфические ТКР Т-клетки от МКПК пациентов с меланомой.

На Фиг. 53 показаны CD8 Т-клеточные ответы от здорового донора крови на рестриктированный HLA-A*0201 пептид (SEQ ID NO: 73) из CLT-антигена 1.

На Фиг. 54 показаны CD8 Т-клеточные ответы от здорового донора крови на рестриктированный HLA-A*0201 пептид (SEQ ID NO: 75) из CLT-антигена 2.

На Фиг. 55 показаны CD8 Т-клеточные ответы от здорового донора крови на рестриктированный HLA-A*0201 пептид (SEQ ID NO: 76) из CLT-антигена 4.

На панелях A-D Фиг. 56 показана чувствительность к рестриктированным HLA-B*0702 пептидам (SEQ ID NO: 74 и 77), из CLT-антигена 1 и CLT-антигена 4, соответственно, в CD45RO-положительных CD8 Т-клетках памяти по сравнению с наивными CD45RO-отрицательными CD8 Т-клетками от того же донора.

На Фиг. 57 показано окрашивание пентамером HLA нормальных CD8 Т-клеток, специфических для пептида (SEQ ID NO: 73), полученного из CLT-антигена 1, пептида (SEQ ID NO: 78), полученного из CLT-антигена 2, и пептида (SEQ ID NO: 77), полученного из CLT-антигена 4.

На Фиг. 58 показаны размноженные, отсортированные при помощи пентамера CD8 Т-клетки, уничтожающие клетки-мишени C1RB7, активированные пептидом (SEQ ID NO: 77), полученным из CLT-антигена 4.

На панелях A-C Фиг. 59 показаны результаты анализа методом количественной ПЦР-РВ для подтверждения транскрипции CLT, кодирующего CLT-антиген 1 (SEQ ID NO: 33), CLT, кодирующего CLT-антиген 2 (SEQ ID NO: 34), и CLT, кодирующего CLT-антиген 3 и 4 (SEQ ID NO: 35), в линиях меланомных клеток.

**ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 1

SEQ ID NO: 2 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 2

SEQ ID NO: 3 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 3

SEQ ID NO: 4 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 4

SEQ ID NO: 5 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 5

SEQ ID NO: 6 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 6

SEQ ID NO: 7 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 7

SEQ ID NO: 8 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 8

SEQ ID NO: 9 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 9

SEQ ID NO: 10 представляет собой полипептидную последовательность CLT-антигена 10

SEQ ID NO: 11-14 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 1

SEQ ID NO: 15 и 16 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 2

SEQ ID NO: 17 и 18 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 3

SEQ ID NO: 19 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 4

SEQ ID NO: 20-22 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 5

SEQ ID NO: 23 и 24 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 6

SEQ ID NO: 25 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 7

SEQ ID NO: 26 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 8

SEQ ID NO: 27-29 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 9

SEQ ID NO: 30-32 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 10

SEQ ID NO: 33 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антиген 1

SEQ ID NO: 34 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антиген 2

SEQ ID NO: 35 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антигены 3 и 4

SEQ ID NO: 36 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антиген 5

SEQ ID NO: 37 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антиген 6

SEQ ID NO: 38 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антигены 7 и 8

SEQ ID NO: 39 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антиген 9

SEQ ID NO: 40 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антиген 10

SEQ ID NO: 41 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 1

SEQ ID NO: 42 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 2

SEQ ID NO: 43 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 3

SEQ ID NO: 44 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 4

SEQ ID NO: 45 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 5

SEQ ID NO: 46 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 6

SEQ ID NO: 47 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 7

SEQ ID NO: 48 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 8

SEQ ID NO: 49 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 9

SEQ ID NO: 50 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 10

SEQ ID NO: 51-52 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 4

SEQ ID NO: 53 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 3

SEQ ID NO: 54 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 4

SEQ ID NO: 55-57 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 1

SEQ ID NO: 58-66 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 2

SEQ ID NO: 67-69 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 3

SEQ ID NO: 70-72 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 4

SEQ ID NO: 73-74 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 1

SEQ ID NO: 75 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 2

SEQ ID NO: 76-77 представляют собой пептидные последовательности, полученные из CLT-антигена 4

SEQ ID NO: 78 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 2

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

*Полипептиды*

Термины «белок», «полипептид» и «пептид» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любой пептидной цепи аминокислот, независимо от длины, котрансляционной или посттрансляционной модификации.

Термин «аминокислота» относится к любой из встречающихся в природе аминокислот, а также к аналогам аминокислот и имитаторам аминокислот, которые действуют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой те 20 L-аминокислот, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые модифицируются позднее, например, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Термин «аналог аминокислоты» относится к соединению, которое имеет ту же базовую химическую структуру, как и у встречающейся в природе аминокислоте, то есть α-углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, но имеет модифицированную R-группу или модифицированный пептидный остов по сравнению с природной аминокислотой. Примеры включают гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид, метионин метилсульфоний и норлейцин. «Имитаторы аминокислот» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует подобно природной аминокислоте. Предпочтительно аминокислота представляет собой встречающуюся в природе аминокислоту или аналог аминокислоты, более предпочтительно встречающуюся в природе аминокислоту и, в частности, одна из тех 20 L-аминокислот, которые кодируются генетическим кодом.

Аминокислоты могут называться в данном документе или своими общеизвестными трехбуквенными обозначениями, или однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Аналогично, нуклеотиды могут называться по их обычно принятым однобуквенным кодам.

Таким образом, изобретение обеспечивает выделенный полипептид, содержащий последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1-10; и

варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательностей из (a)

В изобретении также предложен выделенный полипептид, содержащий последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1-10 минус начальный остаток метионина; и

варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательностей из (a)

В общем, варианты полипептидных последовательностей по изобретению включают последовательности, имеющие высокую степень идентичности с ними. Например, варианты предпочтительно имеют по меньшей мере около 80% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере около 85% идентичности и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 90% идентичности (например, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99%) со связанной эталонной последовательностью по всей их длине.

Предпочтительным вариантом является иммуногенный вариант. Вариант считается иммуногенным вариантом, когда он вызывает ответ, который составляет по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 50% и более предпочтительно по меньшей мере 75% (например, по меньшей мере 90%) активности эталонной последовательности (т.е. последовательности, вариантом которой является вариант), например, в in vitro анализе повторной стимуляции МКПК или цельной крови с полипептидом в качестве антигена (например, повторная стимуляция на период от нескольких часов до 1 года, например, до 6 месяцев, от 1 суток до 1 месяца или от 1 до 2 недель), в котором измеряется активация клеток по лимфопролиферации (например, пролиферации Т-клеток), продукции цитокинов (например, ИФН-гамма) в супернатанте культуры (измеряется с помощью ИФА и т. д.) или характеризуются Т-клеточные ответы путем внутри- и внеклеточного окрашивания (например, с использованием антител, специфичных к иммунным маркерам, таким как CD3, CD4, CD8, ИЛ-2, ФНО-альфа, ИФН-гамма, ИФН типа 1, CD40L, CD69 и т. д.) с последующим анализом на проточном цитометре.

Вариант может, например, быть консервативно модифицированным вариантом. «Консервативно модифицированный вариант» представляет собой вариант, в котором изменение(-я) приводит к замене аминокислоты функционально подобной аминокислотой или к замене/делеции/добавлению остатков, которые существенно не влияют на биологическую функцию варианта. Как правило, такая биологическая функция вариантов будет заключаться в индукции иммунного ответа против меланомы, например, ракового

антигена меланомы кожи.

Таблицы консервативных замен, содержащие функционально похожие аминокислоты, хорошо известны в данной области техники. Варианты могут включать гомологи полипептидов, обнаруженных у других видов.

Вариант полипептида по изобретению может содержать ряд замен, например, консервативных замен (например, 1-25, такие как 1-10, в частности 1-5, и более предпочтительно 1 аминокислотный остаток может быть изменен) по сравнению с эталонной последовательностью. Количество замен, например, консервативных замен, может составлять до 20%, например, до 10%, например, до 5%, например, до 1% от количества остатков в эталонной последовательности. Как правило, консервативные замены попадают в одну из аминокислотных групп, указанных ниже, хотя в некоторых случаях возможны другие замены без существенного влияния на иммуногенные свойства антигена. Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые являются, как правило, консервативными друг для друга:

1) аланин (A), глицин (G);

2) аспарагиновая кислота (D), глютаминовая кислота (E);

3) аспарагин (N), глутамин (Q);

4) аргинин (R), лизин (K);

5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);

6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);

7) серин (S), треонин (T); и

8) цистеин (C), метионин (M)

(см., например, Creighton, Proteins 1984).

Предпочтительно, такие замены не изменяют иммунологическую структуру эпитопа (например, они не встречаются в эпитопной области, картированной в первичной последовательности), и поэтому не оказывают значительного влияния на иммуногенные свойства антигена.

Варианты полипептидов также включают те, в которые вставлены дополнительные аминокислоты по сравнению с эталонной последовательностью, например, такие вставки могут происходить в 1-10 местах (например, в 1-5 местах, предпочтительно в 1 или 2 местах, в частности в 1 месте) и могут, например, включать добавление 50 или менее аминокислот в каждом месте (например, 20 или менее, в частности 10 или менее, более предпочтительно 5 или менее). Предпочтительно, такие вставки не встречаются в эпитопной области и, следовательно, не оказывают значительного влияния на иммуногенные свойства антигена. Один пример вставок включает короткий участок остатков гистидина (например, 2-6 остатков) с целью облегчения экспрессии и/или очистки рассматриваемого антигена.

Варианты полипептидов включают те, в которых аминокислоты были удалены по сравнению с эталонной последовательностью, например, такие делеции могут происходить в 1-10 местах (например, в 1-5 местах, предпочтительно в 1 или 2 местах, в

частности в 1 месте) и могут, например, включать делецию 50 или менее аминокислот в каждом месте (например, 20 или менее, в частности 10 или менее, более предпочтительно 5 или менее). Предпочтительно, такие делеции не встречаются в эпитопной области и, следовательно, не оказывают значительного влияния на иммуногенные свойства антигена.

Специалист поймет, что конкретный вариант белка может содержать замены, делеции и добавления (или любую их комбинацию). Например, замены/делеции/добавления могут усиливать (или иметь нейтральные эффекты) связывание с желаемыми молекулами HLA пациента, потенциально повышая иммуногенность (или оставляя иммуногенность неизменной).

Иммуногенные фрагменты по настоящему изобретению, как правило, содержат по меньшей мере 9 смежных аминокислот из полноразмерной полипептидной последовательности (например, по меньшей мере 9 или 10), такие как по меньшей мере 12 смежных аминокислот (например, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20 смежных аминокислот), в частности, по меньшей мере, 50 смежных аминокислот, например, по меньшей мере 100 смежных аминокислот (например, по меньшей мере 200 смежных аминокислот), в зависимости от длины CLT-антигена. Предпочтительно, иммуногенные фрагменты будут составлять по меньшей мере 10%, например, по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% длины полноразмерной полипептидной последовательности.

Иммуногенные фрагменты, как правило, содержат по меньшей мере один эпитоп. Эпитопы включают В-клеточные и Т-клеточные эпитопы, и предпочтительные иммуногенные фрагменты содержат по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, такой как CD4+ или CD8+ Т-клеточный эпитоп.

Т-клеточные эпитопы представляют собой короткие непрерывные участки аминокислот, которые распознаются Т-клетками (например, CD4+ или CD8+ Т-клетками) при связывании с молекулами HLA. Идентификация Т-клеточных эпитопов может быть достигнута с помощью экспериментов по картированию эпитопов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, Paul, Fundamental Immunology, 3rd ed., 243-247 (1993); Beiβbarth et al., 2005, Bioinformatics,21(Suppl. 1):i29-i37).

В результате ключевого участия Т-клеточного ответа в развитии злокачественного новообразования очевидно, что фрагменты полноразмерных полипептидов SEQ ID NO: 1-10, которые содержат по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, могут быть иммуногенными и могут способствовать иммунологической защите.

Следует понимать, что в разнообразной аутбредной популяции, такой как популяция людей, разные типы HLA означают, что определенные эпитопы могут не распознаваться всеми членами популяции. Предпочтительно, чтобы максимизировать уровень распознавания и масштаб иммунного ответа на полипептид, обычно желательно, чтобы иммуногенный фрагмент содержал множество эпитопов из полноразмерной последовательности (предпочтительно все эпитопы в пределах CLT-антигена).

Конкретные фрагменты полипептидов SEQ ID NO: 1-10, которые могут быть использованы, включают эпитопы, содержащие по меньшей мере один CD8+ Т-клеточный эпитоп, предпочтительно по меньшей мере два CD8+ Т-клеточных эпитопа и более предпочтительно все CD8+ Т-клеточные эпитопы, в частности те, которые связаны с множеством аллелей HLA, например, связанные с 2, 3, 4, 5 или более аллелями). Конкретные фрагменты полипептидов SEQ ID NO: 1-10, которые могут быть использованы, включают эпитопы, содержащие по меньшей мере один CD4+ Т-клеточный эпитоп, предпочтительно по меньшей мере два CD4+ Т-клеточных эпитопа и более предпочтительно все CD4+ Т-клеточные эпитопы (в частности те, которые связаны с множеством аллелей HLA, например, связанные с 2, 3, 4, 5 или более аллелями). Однако специалист в области разработки вакцин может комбинировать экзогенные CD4+ Т-клеточные эпитопы с CD8+ Т-клеточными эпитопами по данному изобретению и может достичь желаемых ответов на CD8+ Т-клеточные эпитопы по изобретению.

Если используется отдельный фрагмент полноразмерного полипептида, такой фрагмент считается иммуногенным, если он вызывает ответ, который составляет по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 50% и более предпочтительно по меньшей мере 75% (например, по меньшей мере 90%) активности эталонной последовательности (т.е. последовательности, фрагментом которой является фрагмент), например, активности в анализе in vitro повторной стимуляции МКПК или цельной крови с полипептидом в качестве антигена (например, повторная стимуляция в течение периода от нескольких часов до 1 года, например, до 6 месяцев, от 1 суток до 1 месяца или от 1 до 2 недель), в котором измеряется активация клеток по лимфопролиферации (например, пролиферации Т-клеток), продукции цитокинов (например, ИФН-гамма) в супернатанте культуры (измеряется с помощью ИФА и т. д.), или в котором характеризуются Т-клеточные ответы путем внутри- и внеклеточного окрашивания (например, с использованием антител, специфичных к иммунным маркерам, таким как CD3, CD4, CD8, ИЛ-2, ФНО-альфа, ИФН-гамма, ИФН типа 1, CD40L, CD69 и т. д.) с последующим анализом на проточном цитометре.

В некоторых случаях множество фрагментов полноразмерного полипептида (которые могут или не могут перекрываться и могут или не могут охватывать всю полноразмерную последовательность) может быть использовано для получения эквивалентного биологического ответа на саму полноразмерную последовательность. Например, по меньшей мере два иммуногенных фрагмента (например, три, четыре или пять), как описано выше, которые в комбинации обеспечивают по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 75% и более предпочтительно по меньшей мере 90% активности эталонной последовательности в in vitro анализе повторной стимуляции МКПК или цельной крови (например, анализ пролиферации Т-клеток и/или продукции ИФН-гамма).

Пример иммуногенных фрагментов полипептидов SEQ ID NO: 1-10 и, следовательно, примеры пептидов по изобретению, включают полипептиды, которые

содержат или состоят из последовательностей SEQ ID NO: 11-32. Дополнительный пример иммуногенных фрагментов полипептидов SEQ ID NO: 1-4, и, следовательно, примеры пептидов по изобретению, включают полипептиды, которые содержат или состоят из последовательностей SEQ ID NO: 51-78. Последовательности SEQ ID NO: 11-17, 19-28, 30-31 и 51-54 были идентифицированы как связанные с молекулами HLA класса I из иммунопептидомного анализа (см. Примеры 2 и 2.1). Последовательности SEQ ID NO: 18, 29 и 32 были идентифицированы как связанные с молекулами HLA класса II из иммунопептидомного анализа (см. Пример 2). Последовательности SEQ ID NO: 55-78 были предсказаны с помощью программного обеспечения NetMHC как связанные с молекулами HLA класса I, и были использованы в иммунологических валидированных методах анализа (см. Примеры 3, 4 и 5).

*Нуклеиновые кислоты*

Изобретение обеспечивает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид по изобретению (называемую нуклеиновой кислотой по изобретению). Например, нуклеиновая кислота изобретения содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 33-40 или 41-50.

Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной макромолекуле, полученной из нуклеотидных мономеров, в частности дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных мономеров. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные остовные остатки или линкерные группы, которые являются встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые имеют сходные свойства с эталонной нуклеиновой кислотой и которые метаболизируются аналогично эталонным нуклеотидам или предназначены для продления периода полувыведения из системы. Примеры таких аналогов включают, без ограничений, тиофосфаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК). Предпочтительно, термин «нуклеиновая кислота» относится к встречающимся в природе полимерам дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных мономеров. Предпочтительно, молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению являются рекомбинантными. Рекомбинантный означает, что молекула нуклеиновой кислоты является продуктом по меньшей мере одной из стадий клонирования, рестрикции или лигирования или других процедур, которые приводят к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, встречающейся в природе (например, в случае кДНК). В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по изобретению представляет собой искусственную последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность кДНК или последовательность нуклеиновой кислоты с предпочтением не встречающихся в природе кодонов). В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению представляют собой ДНК. Альтернативно нуклеиновые кислоты по изобретению представляют собой РНК.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибоунуклеиновая кислота) относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, имеющим остов из сахарных фрагментов, которые являются дезоксирибозильными и рибозильными фрагментами, соответственно. Фрагменты сахара могут быть связаны с азотистыми основаниями, которые представляют собой 4 природных основания (аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и тимин (T) в ДНК и аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U) в РНК). Используемый в данном документе термин «соответствующая РНК» означает РНК, имеющую ту же последовательность, что и эталонная ДНК, но с заменой тимина (T) в ДНК на урацил (U) в РНК. Сахарные фрагменты также могут быть связаны с неприродными азотистыми основаниями, такими как инозин, ксантозин, 7-метилгуанозин, дигидроуридин и 5-метилцитидин. Природные фосфодиэфирные связи между сахарными (дезоксирибозильными/рибозильными) фрагментами могут быть необязательно заменены фосфоротиоатными линкерными группами. Предпочтительные нуклеиновые кислоты по изобретению состоят из природных азотистых оснований, присоединенных к дезоксирибозильному или рибозильному сахарному остову фосфодиэфирными линкерными группами между сахарными фрагментами.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по изобретению представляет собой ДНК. Например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 33-40 или 41-50. Также предложена нуклеиновая кислота, которая содержит или состоит из варианта последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 33-40 или 41-50, вариант которой кодирует ту же аминокислотную последовательность, но имеет другую нуклеиновую кислоту, что обусловлено вырожденностью генетического кода.

Таким образом, из-за вырожденности генетического кода каждый отдельно взятый полипептид может кодироваться большим количеством различных, но функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин указан с помощью кодона, кодон может быть изменен на любой описанный соответствующий кодон без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты приводят к «молчащим» (иногда называемым «вырожденным» или «синонимичным») вариантам, которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариантов. Каждая описанная в данном документе последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также делает возможной любой возможной молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалист поймет, что каждый кодон в последовательности нуклеиновых кислот (за исключением AUG, который в обычной ситуации является единственным кодоном для метионина, и UGG, который в обычной ситуации является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, неявно присутствует в каждой описанной последовательности и представлен

в виде аспекта изобретения.

Замещения вырожденных кодонов могут также достигаться путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или большего числа выбранных (или всех) кодонов замещена на остатки смешанных азотистых оснований и/или дезоксиинозина (Batzer et al., 1991, Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al., 1985, J. Biol. Chem. 260:2605-2608; Rossolini et al., 1994, Mol. Cell. Probes 8:91-98).

Нуклеиновая кислота по изобретению, которая содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 33-40 или 41-50, может содержать ряд молчащих вариантов (например, 1-50, таких как 1-25, в частности 1-5, и более предпочтительно 1 кодон может быть изменен) по сравнению с эталонной последовательностью.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по изобретению представляет собой РНК. Предложены последовательности РНК, которые соответствуют последовательности ДНК, представленной в данном документе, и имеют рибонуклеотидный остов вместо дезоксирибонуклеотидного остова и имеют азотистое основание урацил (U) в боковой цепи вместо тимина (T).

Таким образом, нуклеиновая кислота по изобретению содержит или состоит из РНК-эквивалента последовательности кДНК, выбранной из SEQ ID NO: 33-40 или 41-50 и могут содержать ряд молчащих вариантов (например, 1-50, в том числе 1-25, в частности, 1-5 и более предпочтительно 1 кодон могут быть изменены) по сравнению с эталонной последовательностью. Под «РНК-эквивалентом» подразумевается последовательность РНК, которая содержит ту же генетическую информацию, что и эталонная последовательность кДНК (т.е. содержит те же кодоны с рибонуклеотидным остовом вместо дезоксирибонуклеотидного остова и с азотистым основанием урацил (U) в боковой цепи вместо тимина (T)).

Изобретение также содержит последовательности, которые комплементарны вышеупомянутым последовательностям кДНК и РНК.

В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению кодон-оптимизированы для экспрессии в человеческой клетке-хозяине.

Нуклеиновые кислоты по изобретению способны транскрибироваться и транслироваться в полипептиды по изобретению в случае нуклеиновых кислот ДНК и транслироваться в полипептиды по изобретению в случае нуклеиновых кислот РНК.

*Полипептиды и нуклеиновые кислоты*

Предпочтительно, полипептиды и нуклеиновые кислоты, используемые в данном изобретении, выделяют. «Выделенный» полипептид или нуклеиновая кислота представляет собой полипептид, удаленный из первоначального окружения. Например, встречающийся в природе полипептид или нуклеиновую кислоту выделяют, если они отделены от некоторых или всех сосуществующих материалов в естественной системе. Нуклеиновую кислоту считают выделенной, если, например, она клонируется в вектор, который не является частью ее естественного окружения.

Термин «встречающийся в природе» при использовании со ссылкой на последовательность полипептида или нуклеиновой кислоты означает последовательность, встречающуюся в природе и не модифицированную синтетически.

Термин «искусственный» при использовании со ссылкой на последовательность полипептида или нуклеиновой кислоты означает последовательность, которая не встречается в природе, которая, например, является синтетической модификацией природной последовательности или содержит неприродную последовательность.

Термин «гетерологичный» при использовании со ссылкой на отношение одной нуклеиновой кислоты или полипептида к другой нуклеиновой кислоте или полипептиду, указывает на то, что две или более последовательностей не находятся в одинаковых взаимоотношениях в природе. «Гетерологичная» последовательность может также означать последовательность, которая не выделена, не получена или не основана на встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида, обнаруженной в организме-хозяине.

Как отмечалось выше, варианты полипептидов предпочтительно имеют по меньшей мере около 80% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере около 85% идентичности и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 90% идентичности (например, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99%) со связанной эталонной последовательностью по всей их длине.

В целях сравнения двух близкородственных полипептидных или полинуклеотидных последовательностей может быть рассчитан «% идентичности последовательностей» между первой последовательностью и второй последовательностью. Полипептидные последовательности считаются такими же или идентичными другим полипептидным последовательностям, если они имеют 100% идентичности последовательностей по всей своей длине. Остатки в последовательностях нумеруются слева направо, то есть от N- до С-конца для полипептидов. Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент одинаковых аминокислотных остатков (т. е., 70% идентичности, необязательно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности в заданной области) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения. Предпочтительно, сравнение выполняется в окне, соответствующем всей длине эталонной последовательности.

Для сравнения последовательностей одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравниваются исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры

алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основании программных параметров.

«Окно сравнения», используемое в данном документе, относится к сегменту, по которому последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью на таком же количестве непрерывных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии согласно Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритма выравнивания областей гомологии согласно Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, поиска по методу сходства согласно Pearson & Lipman, 1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* USA 85:2444, компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или ручного выравнивания и путем визуальной проверки (см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).

Одним из примеров подходящего алгоритма является PILEUP. Алгоритм PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы связанных последовательностей с использованием прогрессивных парных выравниваний, чтобы показать взаимосвязь и процент идентичности последовательностей. Он также строит дерево или дендограмму, демонстрирующую отношения кластеризации, используемые для создания выравнивания. Алгоритм PILEUP использует упрощение метода прогрессивного выравнивания Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360. Используемый метод аналогичен методу, описанному Higgins & Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Программа может выравнивать до 300 последовательностей, каждая из которых имеет максимальную длину 5000 нуклеотидов или аминокислот. Процедура множественного выравнивания начинается с попарного выравнивания двух наиболее похожих последовательностей, в результате чего получается кластер из двух выровненных последовательностей. Затем этот кластер выравнивают со следующей наиболее родственной последовательностью или кластером выровненных последовательностей. Для выравнивания двух кластеров последовательностей используют простое расширение метода попарного выравнивания двух отдельных последовательностей. Окончательное выравнивание достигается серией последовательных попарных выравниваний. Программа запускается путем обозначения конкретных последовательностей и их аминокислотных координат для областей сравнения последовательностей и путем обозначения параметров программы. Используя PILEUP, эталонная последовательность сравнивается с другими исследуемыми

последовательностями для определения процентного соотношения идентичности последовательностей с использованием следующих параметров: штраф за делецию по умолчанию(3,00), штраф за продолжение делеции по умолчанию (0,10) и штраф за продолжение делеции по умолчанию. PILEUP можно получить из пакета программного обеспечения для анализа последовательностей GCG, например, версии 7.0 (Devereaux et al., 1984, Nuc. Acids Res. 12:387-395).

Другим примером алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 и Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (веб-сайт: www.ncbi.nlm.nih.gov/). Данный алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар высококачественных последовательностей (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в искомой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при совмещении со словом той же длины в последовательности базы данных. T называют пороговым показателем сходства соседних слов (Altschul et al. выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как образец для инициации поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный показатель выравнивания можно увеличивать. Совокупные баллы вычисляются с использованием параметров M для нуклеотидных последовательностей (балл вознаграждения для пары совпадающих остатков; всегда> 0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей, матрица подсчета балов используются для расчета совокупного балла. Расширение зачетов слов в каждом направлении прекращает, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от его максимального достигнутого значения; совокупный балл стремится к нулю или ниже, вследствие накопления одного или более отрицательных баллов выравнивания остатков; или в конце каждой последовательности. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP по умолчанию используют длину слова, равную 3, и ожидание (E), равное 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см., Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) выравнивания (B), равные 50, ожидание (E), равное 10, M=5, N=-4 и сравнение обоих цепей.

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin & Altschul, 1993, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Одно измерение сходства, проводимое алгоритмом BLAST, заключается в определении наименьшей суммарной вероятности (P(N)), которая указывает на вероятность при которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей будет происходить случайно.

«Различие» между последовательностями относится к вставке, делеции или замене

одного остатка в положении второй последовательности по сравнению с первой последовательностью. Две последовательности могут содержать одно, два или более таких различий. Вставки, делеции или замены во второй последовательности, которая в остальном идентична (100% идентичности последовательности) первой последовательности, приводит к снижению % идентичности последовательностей. Например, если идентичные последовательности состоят из 9 остатков, одна замена во второй последовательности приводит к идентичности последовательностей в 88,9%. Если идентичные последовательности состоят из 17 аминокислотных остатков, две замены во второй последовательности приводят к идентичности последовательностей в 88,2%.

В качестве альтернативы, для целей сравнения первой эталонной последовательности со второй сравниваемой последовательностью может быть установлено количество добавлений, замен и/или делеций, сделанных в первой последовательности для получения второй последовательности. Добавление представляет собой добавление одного остатка в первую последовательность (включая добавление на любом конце первой последовательности). Замена представляет собой замену одного остатка в первой последовательности на один другой остаток. Делеция представляет собой делецию одного остатка из первой последовательности (включая делецию на любом конце первой последовательности).

*Получение полипептидов по изобретению*

Полипептиды по изобретению можно получать и манипулировать ими, используя способы, раскрытые, например, в Green and Sambrook 2012 Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press. В частности, для получения полинуклеотидов можно использовать синтез искусственных генов (Nambiar et al., 1984, Science, 223:1299-1301, Sakamar and Khorana, 1988, Nucl. Acids Res., 14:6361-6372, Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323 и Grundstrom et al., 1985, Nucl. Acids Res., 13:3305-3316) с последующей экспрессией в подходящем организме для получения полипептидов. Ген, кодирующий полипептид по изобретению, может быть получен синтетическим путем, например, при помощи твердофазного синтеза ДНК. Целые гены могут быть синтезированы de novo без необходимости в предшественнике ДНК-матрицы. Для получения желаемого олигонуклеотида структурные звенья последовательно связывают с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, требуемом последовательностью продукта. По завершении сборки цепи продукт высвобождают из твердой фазы в раствор, снимают защиту и собирают. Продукты могут быть выделены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для получения желаемых олигонуклеотидов высокой чистоты (Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem. 67:99-134). Эти относительно короткие сегменты легко собираются с помощью различных методов амплификации генов (Methods Mol Biol., 2012; 834:93-109) в более длинные молекулы ДНК, подходящие для использования в бесчисленных системах экспрессии на основе рекомбинантной ДНК. В контексте этого изобретения специалист в данной области техники поймет, что полинуклеотидные последовательности, кодирующие

полипептидные антигены, описанные в данном изобретении, можно легко использовать в различных системах продукции вакцин, включая, например, вирусные векторы.

Для целей продукции полипептидов по изобретению в микробиологическом хозяине (например, бактериальном или грибном) нуклеиновые кислоты по изобретению будут содержать подходящие регуляторные и контрольные последовательности (включая промоторы, сигналы терминации и т. д.) и последовательности, способствующие секреции полипептидов, подходящие для продукции белка в организме хозяина. Точно так же полипептиды по изобретению могут быть получены путем трансдукции культур эукариотических клеток (например, клеток яичников китайского хомячка или клеток S2 дрозофилы) нуклеиновыми кислотами по изобретению, которые были объединены с подходящими регуляторными и контрольными последовательностями (включая промоторы, сигналы терминации и т. д.) и последовательностями, способствующими секреции полипептидов, подходящими для продукции белка в этих клетках.

Улучшенное выделение полипептидов по изобретению, полученных с помощью рекомбинантных средств, необязательно может быть облегчено путем добавления участка остатков гистидина (обычно известного как His-метка) к одному концу полипептида.

Полипептиды также могут быть получены синтетическим путем.

*Векторы*

В дополнительных вариантах осуществления генетические конструкты, содержащие одну или более нуклеиновых кислот по изобретению, вводят в клетки in vivo, так что полипептид по изобретению продуцируется in vivo, вызывая иммунный ответ. Нуклеиновая кислота (например, ДНК) может присутствовать в любой из множества систем доставки, известных специалистам в данной области техники, включая системы экспрессии нуклеиновых кислот, бактерии и некоторые системы вирусной экспрессии. В данной области техники хорошо известны многочисленные Способы доставки генов, такие как описанные в Rolland, 1998, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, и ссылки, цитируемые в них. Некоторые из этих подходов описаны ниже с целью иллюстрации.

Соответственно, предложен вектор (также называемый в данном документе «конструктом экспрессии ДНК» или «конструктом»), содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению.

Предпочтительно, вектор содержит регуляторные элементы, кодирующие нуклеиновую кислоту (такие как предпочтительный промотор и сигнал терминации), подходящие для обеспечения транскрипции трансляционно активной молекулы РНК в человеческой клетке-хозяине. «Трансляционно активная молекула РНК» представляет собой молекулу РНК, способную транслироваться в белок с помощью аппарата трансляции клетки человека.

Соответственно, предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по изобретению (далее «вектор по изобретению»).

В частности, вектор может представлять собой вирусный вектор. Вирусный вектор

может представлять собой аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV) (например, AAV типа 5 и типа 2), альфавирус (например, вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирусом Синдбис (SIN), вирус леса Семлики (SFV)), вирус герпеса, аренавирус (например, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV)), вирус кори, поксвирус (например, модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA)), парамиксовирус, лентивирус или рабдовирус (например, вирус везикулярного стоматита (VSV)), т.е. вектор может происходить от любого из вышеупомянутых вирусов. Аденовирусы особенно подходят для применения в качестве вектора для переноса генов из-за их среднего размера генома, простоты манипуляции, высокого титра, широкого диапазона клеток-мишеней и высокой инфекционности. Оба конца вирусного генома содержат инвертированные повторы (ITR) из 100-200 пар азотистых оснований, которые являются цис-элементами, необходимыми для репликации и упаковки вирусной ДНК. Ранняя (E) и поздняя (L) области генома содержат разные единицы транскрипции, которые разделяются началом репликации вирусной ДНК. Область E1 (E1A и E1B) кодирует белки, ответственные за регуляцию транскрипции вирусного генома и некоторых клеточных генов. Экспрессия области E2 (E2A и E2B) приводит к синтезу белков для репликации вирусной ДНК. Эти белки участвуют в репликации ДНК, поздней экспрессии генов и отключении клеток-хозяев (Renan, 1990). Продукты поздних генов, включая большинство белков вирусного капсида, экспрессируются только после значительного процессинга одного первичного транскрипта, полученные от главного позднего промотора (MLP). MLP особенно эффективен во время поздней фазы инфекции, и все мРНК, транскрибируемые с этого промотора, обладают тройной 5'-лидерной последовательностью (TPL), что делает их предпочтительными мРНК для трансляции. Дефицитные по репликации аденовирусы, которые создаются из вирусных геномов, в которых удален один или более ранних генов, особенно полезны, поскольку они имеют ограниченную репликацию и меньшую вероятность распространения патогенов внутри вакцинированного хозяина и контактов с вакцинированным хозяином.

*Доставка других полинуклеотидов*

В определенных вариантах осуществления изобретения конструкт экспрессии, содержащий одну или более полинуклеотидных последовательностей, может просто состоять из голых плазмид с рекомбинантной ДНК. См. Ulmer et al., 1993, Science 259:1745-1749 и обзор в Cohen, 1993, Science 259:1691-1692. Перенос конструкта может быть осуществлен, например, любым способом, обеспечивающим физическую или химическую проницаемость клеточной мембраны. Это особенно применимо для переноса in vitro, но может быть применено и для использования in vivo. Предполагается, что ДНК, кодирующая представляющий интерес ген, также может быть перенесена аналогичным образом in vivo и экспрессировать генный продукт. Для доставки молекул ДНК животным моделям и человеку использовали множество систем доставки. Некоторые продукты, основанные на этой технологии, были лицензированы для использования на животных, а другие проходят клинические исследования 2-й и 3-й фазы с участием людей.

*Доставка РНК*

В других вариантах осуществления изобретения конструкт экспрессии, содержащий одну или более полинуклеотидных последовательностей, может состоять из «голых» молекул РНК, полученных из рекомбинантной ДНК (Ulmer et al., 2012, Vaccine 30:4414-4418). Что касается конструтов экспрессии на основе ДНК, то можно использовать различные способы для введения молекул РНК в клетки in vitro или in vivo. Конструкты на основе РНК могут быть сконструированы так, чтобы имитировать молекулы простой матричной РНК (мРНК), так что введенная биологическая молекула напрямую транслируется трансляционным аппаратом клетки-хозяина для продуцирования кодируемого ею полипептида в клетках, в которые она была введена. Альтернативно, молекулы РНК могут быть сконструированы таким образом, чтобы они могли самоамплифицироваться в клетках, в которые они были введены, путем включения в их структуру генов вирусных РНК-зависимых РНК-полимераз. Таким образом, эти типы молекул РНК, известные как молекулы самоамплифицирующейся мРНК (SAM$^{TM}$) (Geall et al. 2012, PNAS, 109:14604-14609), обладают общими свойствами с некоторыми вирусными векторами на основе РНК. РНК на основе мРНК или РНК SAM$^{TM}$ могут быть дополнительно модифицированы (например, путем изменения их последовательностей или использования модифицированных нуклеотидов) для повышения стабильности и трансляции (Schlake et al., RNA Biology, 9:1319-1330), и оба типы РНК могут быть составлены (например, в эмульсиях (Brito et al., Molecular Therapy, 2014 22:2118-2129) или липидных наночастицах (Kranz et al., 2006, Nature, 534:396-401)) для обеспечения стабильности и/или проникновения в клетки in vitro или in vivo. Множество составов модифицированных (и немодифицированных) РНК были протестированы в качестве вакцин на животных моделях и с участием людей, а многочисленные вакцины на основе РНК используются в текущих клинических исследованиях.

*Фармацевтические композиции*

Полипептиды, нуклеиновые кислоты и векторы по изобретению могут быть составлены для доставки в фармацевтических композициях, таких как иммуногенные композиции и вакцинные композиции (все в дальнейшем «композиции по изобретению»). Композиции по изобретению предпочтительно содержат полипептид, нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Таким образом, в одном варианте осуществления предложена иммуногенная фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

В другом варианте осуществления предложена вакцинная композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Приготовление фармацевтических композиций в целом описано, например, в Powell & Newman, eds., Vaccine Design (подход с использованием субъединиц и адъювантов), 1995. Композиции по изобретению могут также содержать другие соединения, которые могут быть биологически активными или неактивными.

Предпочтительно, композиция по изобретению представляет собой стерильную композицию, подходящую для парентерального введения.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции по изобретению, которые содержат один или более (например, один) полипептидов по изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены композиции по изобретению, которые содержат одну или более (например, одну) нуклеиновых кислот по изобретению, или один или более (например, один) векторов по изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

В одном варианте осуществления композиции по изобретению могут содержать один или более (например, один) полинуклеотидов и один или более (например, один) полипептидных компонентов. Альтернативно, композиции могут содержать один или более (например, один) векторов и один или более (например, один) полипептидных компонентов. Альтернативно, композиции могут содержать один или более (например, один) векторов и один или более (например, один) полинуклеотидных компонентов. Такие композиции могут обеспечивать усиленный иммунный ответ.

*Фармацевтически приемлемые соли*

Будет очевидно, что композиция по изобретению может содержать фармацевтически приемлемые соли нуклеиновых кислот или полипептидов, предложенных в данном документе. Такие соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых нетоксичных оснований, включая органические основания (например, соли первичных, вторичных и третичных аминов и основных аминокислот) и неорганические основания (например, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция и магния).

*Фармацевтически приемлемые носители*

Хотя многие фармацевтически приемлемые носители, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы в композициях по изобретению, оптимальный тип используемого носителя будет варьироваться в зависимости от способа введения. Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для любого подходящего способа введения, включая, например, парентеральное, местное, пероральное, назальное, внутривенное, внутричерепное, внутрибрюшинное, подкожное или внутримышечное введение, предпочтительно парентеральное, например, внутримышечное, подкожное или внутривенное введение. Для парентерального введения носитель предпочтительно включает воду и может содержать буферы для контроля pH, стабилизирующие агенты, например, поверхностно-активные вещества и аминокислоты, и агенты, модифицирующие тоничность, например, соли и сахара. Если композиция предназначена для обеспечения в лиофилизированной форме для разбавления в месте использования, композиция может содержать лиопротектор, например, сахара, такие как трегалоза. Для перорального введения можно использовать любой из вышеуказанных

носителей или твердый носитель, такой как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлоза, глюкоза, сахароза и карбонат магния.

Таким образом, композиции по изобретению могут содержать буферы (например, физиологический раствор с нейтральным буфером или физиологический раствор с фосфатным буфером), углеводы (например, глюкозу, маннозу, сахарозу или декстраны), маннит, белки, полипептиды или аминокислоты, такие как глицин, антиоксиданты, бактериостатики, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион, растворенные вещества, которые делают состав изотоническим, гипотоническим или слабо гипертоническим по отношению к крови реципиента, суспендирующие агенты, загустители и/или консерванты. Альтернативно, композиции по изобретению могут быть составлены в виде лиофилизата.

*Иммуностимуляторы*

Композиции по изобретению могут также содержать один или более иммуностимуляторов. Иммуностимулятором может быть любое вещество, которое усиливает или потенцирует иммунный ответ (опосредованный антителами и/или клетками) на экзогенный антиген. Примеры иммуностимуляторов, которые часто называют адъювантами в контексте вакцин, включают соли алюминия, такие как гель гидроксида алюминия (квасцы) или фосфат алюминия, сапонины, включая QS21, иммуностимулирующие олигонуклеотиды, такие как CPG, эмульсия типа «масло в воде» (например, когда масло представляет собой сквален), аминоалкилглюкозаминид 4-фосфаты, липополисахарид или его производное, например 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL®) и другие лиганды TLR4, лиганды TLR7, лиганды TLR8, лиганды TLR9, ИЛ-12 и интерфероны. Таким образом, предпочтительно один или более иммуностимуляторов композиции по изобретению выбраны из солей алюминия, сапонинов, иммуностимулирующих олигонуклеотидов, эмульсий типа «масло в воде», аминоалкилглюкозаминид-4-фосфатов, липополисахаридов и их производных и других лигандов TLR4, лигандов TLR7, лигандов TLR8 и лигандов TLR9. Иммуностимуляторы могут также включать моноклональные антитела, которые специфически взаимодействуют с другими иммунными компонентами, например, моноклональными антителами, которые блокируют взаимодействие рецепторов иммунных контрольных точек, включая PD-1 и CTLA4.

В случае способов доставки рекомбинантных нуклеиновых кислот (например, ДНК, РНК, вирусные векторы) гены, кодирующие иммуностимуляторы на основе белков, могут быть легко доставлены вместе с генами, кодирующими полипептиды по изобретению.

*Замедленное высвобождение*

Композиции, описанные в данном документе, можно вводить как часть состава с замедленным высвобождением (т.е. состава, такого как капсула, губка, пластырь или гель (состоящий, например, из полисахаридов)), который обеспечивает медленное/замедленное высвобождение соединения после введения.

*Хранение и упаковка*

Композиции по изобретению могут быть представлены в контейнерах для однодозовой или многодозовой дозы, таких как запаянные ампулы или флаконы. Такие контейнеры предпочтительно герметично закрываются для сохранения стерильности состава до применения. Как правило, составы могут храниться в виде суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных носителях. Альтернативно, композиция по изобретению может храниться в лиофилизированных условиях, требуя только добавления стерильного жидкого носителя (такого как вода или физиологический раствор для инъекций) непосредственно перед применением.

*Дозировка*

Количество нуклеиновой кислоты, полипептида или вектора в каждой композиции по изобретению может быть получено таким образом, чтобы была получена подходящая дозировка для терапевтического или профилактического применения. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полувыведения, способ введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические факторы будут рассмотрены специалистом в области получения таких композиций, и поэтому могут быть желательны различные дозировки и схемы лечения.

Как правило, композиции, содержащие терапевтически или профилактически эффективное количество, доставляют от около 0,1 мкг до около 1000 мкг полипептида по изобретению на введение, более типично от около 2,5 мкг до около 100 мкг полипептида на введение. Если доставляется в форме коротких синтетических длинных пептидов, дозы могут варьироваться от 1 до 200 мкг/пептид/доза. Что касается полинуклеотидных композиций, они обычно доставляют от около 10 мкг до около 20 мг нуклеиновой кислоты по изобретению на введение, более типично от около 0,1 мг до около 10 мг нуклеиновой кислоты по изобретению на введение.

*Заболевания, которые нужно лечить или предотвращать*

Как отмечено в другом месте, SEQ ID NO: 1-10 представляют собой полипептидные последовательности, соответствующие CLT-антигенам, которые сверхэкспрессируются при меланоме кожи.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор или композицию по изобретению для применения в медицине.

Дополнительные аспекты изобретения относятся к способу формирования иммунного ответа у человека, который включает введение указанному человеку полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по изобретению.

Настоящее изобретение также обеспечивает полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор или композицию по изобретению для применения в формировании иммунного ответа у человека.

Также обеспечивается применение полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по изобретению для производства лекарственного препарата для

применения в формировании иммунного ответа у человека.

Предпочтительно, формируется иммунный ответ против злокачественной опухоли, экспрессирующей соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и вариантов, и иммуногенных фрагментов любой из них. Под «соответствующей» в данном контексте подразумевается, что если опухоль экспрессирует, скажем, SEQ ID NO: A (A представляет собой одну из SEQ ID NO: 1-10) или ее вариант или иммуногенный фрагмент, тогда полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по изобретению и лекарственные препараты, содержащие их, будут основаны на SEQ ID NO: A или ее варианте или иммуногенном фрагменте.

Предпочтительно иммунный ответ включает CD8+ Т-клеточный ответ, CD4+ Т-клеточный ответ и/или образование антител, в частности ответ цитолитических CD8+ Т-клеток и CD4+ Т-хелперный ответ.

Предпочтительно иммунный ответ возникает против опухоли, в частности, опухоли, экспрессирующей последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и их вариантов, и их иммуногенных фрагментов.

В предпочтительном варианте осуществления опухоль представляет собой меланомную опухоль, например, меланомную опухоль кожи.

Опухоль может представлять собой первичную опухоль или метастатическую опухоль.

Дополнительные аспекты изобретения относятся к способу лечения пациента-человека, страдающего злокачественным новообразованием, при котором раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или предотвращения злокачественного новообразования у человека, которое может экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, причем способ включает введение указанному человеку соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по изобретению.

Настоящее изобретение также относится к полипептиду, нуклеиновой кислоте, вектору или композиции по изобретению для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них.

Транскрипты, соответствующие SEQ ID NO: 33, 35, 36 и 40, также были сверхэкспрессированы при увеальной меланоме. Следовательно, в альтернативном варианте осуществления опухоль представляет собой увеальную меланомную опухоль и/или опухоль экспрессирует последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10.

Таким образом, изобретение обеспечивает способ или полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция для применения в соответствии с изобретением, причем полипептид содержит последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10; и

варианта последовательностей из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 и 76-77 и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33, 35, 36 или 40, или выбранной из любой из 41, 43, 44, 45 и 50;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

Слова «предупреждение» и «профилактика» используются в данном документе взаимозаменяемо.

*Схемы лечения и вакцинации*

Терапевтическая схема может включать или одновременную (например, совместное введение), или последовательную (например, прайм-буст) доставку (i) полипептида, нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению и (ii) одного или более дополнительных полипептидов, нуклеиновых кислот или векторов по изобретению и/или (iii) дополнительного компонента, такого как ряд других терапевтически полезных соединений или молекул, таких как антигенные белки, необязательно одновременно вводимые с адъювантом. Примеры совместного введения включают гомолатеральное совместное введение и контралатеральное совместное введение. «Одновременное» введение предпочтительно относится ко всем компонентам, доставляемым во время одного и того же цикла лечения. Предпочтительно, все компоненты вводятся одновременно (например, одновременное введение и ДНК, и белка), однако один компонент может быть введен в течение нескольких минут (например, во время одного и того же медицинского приема или визита врача) или в течение нескольких часов.

В некоторых вариантах осуществления за «праймированием» или первым введением полипептида, нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению следует одно или более «бустирований» или последующих введений полипептида, нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению (методика «прайм-буст»). В одном варианте осуществления полипептид, нуклеиновая кислота или вектор по изобретению используют в схеме прайм-буст вакцинации. В одном варианте осуществления как праймирование, так и бустирование относятся к полипептиду по изобретению, который представляет собой один и тот же полипептид по изобретению в каждом случае. В одном из вариантов осуществления как праймирование, так и бустирование относится к нуклеиновой кислоту или вектору по изобретению, которые представляют собой одну и ту же нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению. В качестве альтернативы, праймирование можно проводить с использованием нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению, а бустирование можно проводить использованием полипептида по изобретению, или праймирование можно проводить с использованием полипептида по изобретению, а бустирование можно проводить с использованием нуклеиновой кислоты или вектора по

изобретению. Как правило, за «праймированием» или первым введением примерно через 1-12 недель или 4-6 проводят «бустирование» или второе введение. Последующие введения «бустерных доз» можно проводить каждые 1-6 недель или гораздо позже (до нескольких лет).

*Комбинации антигенов*

Полипептиды, нуклеиновые кислоты или векторы по изобретению можно использовать в комбинации с одним или более другими полипептидами или нуклеиновыми кислотами, векторами по изобретению и/или другими антигенными полипептидами (или полинуклеотидами или векторами, кодирующими их), которые вызывают формирование иммунного ответа против меланомы, например, меланомы кожи или увеальной меланомы. Эти другие антигенные полипептиды могут быть получены из различных источников, они могут включать хорошо описанные ассоциированные с меланомой антигены, такие как GPR143, PRAME, MAGE-A3 или pMel (gp100). В качестве альтернативы они могут включать другие типы меланомных антигенов, включая специфические для пациента неоантигены (Lauss et al. (2017). Nature Communications, 8(1), 1738. http://doi.org/10.1038/s41467-017-01460-0), неоантигены с сохраненным интроном (Smart et al. (2018). Nature Biotechnology. http://doi.org/10.1038/nbt.4239), сплайсированные варианты неоантигенов (Hoyos et al., Cancer Cell, 34(2), 181-183. http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.008; Kahles et al. (2018). Cancer Cell, 34(2), 211-224.e6. http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.001), меланомные антигены, которые подпадают под категорию, известную как антигены, кодирующие Т-клеточные эпитопы, связанные с нарушенным процессингом пептидов (TIEPP; Gigoux, M., & Wolchok, J. (2018). JEM, 215, 2233, Marijt et al. (2018). JEM 215, 2325), или неоантигены, которые будут открыты (включая CLT-антигены). Кроме того, антигенные пептиды из этих различных источников также можно комбинировать с (i) неспецифическими видами иммуностимуляторов/адъювантов и/или (ii) антигенами, например, содержащими универсальные эпитопы CD4 хелперов, которые, как известно, активируют сильные CD4 Т-хелперы (доставляемые в виде полипептидов, или в виде полинуклеотидов, или векторов, кодирующих эти антигены CD4), для усиления антимеланомных специфических ответов, вызываемых совместно вводимыми антигенами.

Различные полипептиды, нуклеиновые кислоты или векторы могут быть составлены в одном и том же составе или в отдельных составах. Альтернативно, полипептиды могут быть предоставлены в виде слитых белков, в которых полипептид по изобретению слит со вторым или дополнительным полипептидом (см. ниже).

Могут быть предоставлены нуклеиновые кислоты, кодирующие вышеупомянутые слитые белки.

В более общем смысле, когда два или более компонента используются в комбинации, компоненты могут быть представлены, например:

(1) в виде двух или более отдельных антигенных полипептидных компонентов;

(2) в виде слитого белка, содержащего оба (или дополнительные) полипептидных компонента;

(3) в виде одного или более полипептидов и одного или более полинуклеотидных компонентов;

(4) в виде двух или более отдельных полинуклеотидных компонентов;

(5) в виде одного полинуклеотида, кодирующего два или более отдельных полипептидных компонента; или

(6) в виде одного полинуклеотида, кодирующего слитый белок, содержащий оба (или дополнительные) полипептидных компонента.

Для удобства часто желательно, чтобы при наличии ряда компонентов они содержались в одном слитом белке или в полинуклеотиде, кодирующем один слитый белок (см. ниже). В одном варианте осуществления изобретения все компоненты предложены в виде полипептидов (например, в пределах одного слитого белка). В альтернативном варианте осуществления изобретения все компоненты предложены в виде полинуклеотидов (например, одного полинуклеотида, такого как один полинуклеотид, кодирующий один слитый белок).

*Слитые белки (слитые полипептиды)*

В качестве варианта осуществления приведенного выше обсуждения комбинаций антигенов в изобретении также предложен выделенный полипептид по изобретению, слитый со вторым или дополнительным полипептидом по изобретению (далее «комбинированный полипептид по изобретению»), путем создания конструктов нуклеиновых кислот, в которых слиты последовательности, кодирующие отдельные антигены. Ожидается, что комбинированные полипептиды по изобретению будут иметь полезные свойства, описанные в данном документе для полипептидов по изобретению, и могут иметь преимущество в виде превосходной иммуногенной или вакцинной активности, профилактического или терапевтического эффекта (включая увеличение широты и глубины ответов), и могут быть особенно ценными для аутбредной популяции. Гибриды полипептидов по изобретению могут также обеспечить преимущество в повышении эффективности конструирования и производства вакцинных антигенов и/или векторных вакцин (включая вакцины на основе нуклеиновых кислот).

Как описано выше в разделе «Комбинации антигенов», полипептиды по изобретению и комбинированные полипептиды по изобретению также могут быть слиты с полипептидными последовательностями, которые не являются полипептидами по изобретению, включая один или более из:

других полипептидов, которые являются ассоциированными с меланомой антигенами и, следовательно, потенциально полезными в качестве иммуногенных последовательностей в вакцине (например, GPR143, PRAME, MAGE-A3 и pMel (gp100), упомянутые выше); и

полипептидные последовательности, которые способны усиливать иммунный ответ (т.е. иммуностимулирующие последовательности).

Полипептидные последовательности, например, содержащие универсальные эпитопы CD4 хелперов, которые способны обеспечивать сильную CD4+ помощь в усилении CD8+ Т-клеточных ответов на эпитопы CLT-антигена.

Иллюстративные слитые полипептиды содержат две или более (например, две, три или четыре) последовательности, выбранные из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4; или, в отношении каждой из указанных последовательностей, вариант последовательности или иммуногенный фрагмент последовательности.

Иллюстративный слитый полипептид содержит:

(i) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 1; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a), например, выбранной из SEQ ID NO: 11-14, 55-57 и 73-74; и

(ii) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 2; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a), например, выбранной из SEQ ID NO: 15-16, 58-66, 75 и 78; и

(iii) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 3; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a), например, выбранной из SEQ ID NO: 17-18, 53 и 67-69; и

(iv) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 4; и

варианта последовательности из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), например, выбранной из SEQ ID NO: 19, 51-52, 54, 70-72 и 76-77.

Например, слитый полипептид содержит последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4.

Другой иллюстративный слитый полипептид содержит:

(i) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 1; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a), например, выбранной из SEQ ID NO: 11-14, 55-57 и 73-74; и

(ii) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 2; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a), например, выбранной из

SEQ ID NO: 15-16, 58-66, 75 и 78; и

(iii) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 4; и

варианта последовательности из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), например, выбранной из SEQ ID NO: 19, 51-52, 54, 70-72 и 76-77.

Например, слитый полипептид содержит последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 4.

Изобретение также обеспечивает нуклеиновые кислоты, кодирующие вышеупомянутые слитые полипептиды, и другие аспекты изобретения (векторы, композиции, клетки и т.д.) mutatis mutandis в отношении полипептидов по изобретению.

*Полипептиды, связывающие CLT-антигены*

Антигенсвязывающие полипептиды, которые являются иммуноспецифическими в отношении экспрессируемых опухолью антигенов (полипептиды по изобретению), могут быть созданы для рекрутинга цитолитических клеток к несущим антиген опухолевым клеткам, опосредуя их разрушение. Один из таких механизмов рекрутинга цитолитических клеток антигенсвязывающими полипептидами известен как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ). Таким образом, изобретение обеспечивает антигенсвязывающий полипептид, который является иммуноспецифическим для полипептида по изобретению. Антигенсвязывающие полипептиды, включая антитела, такие как моноклональные антитела и их фрагменты, например, доменные антитела, фрагменты Fab, фрагменты Fv и фрагменты VHH, которые могут продуцироваться у отличных от человека видов животных (например, грызунов или верблюдов) и гуманизированы или могут быть получены у отличных от человека видов (например, грызунов, генетически модифицированных таким образом, чтобы иметь иммунную систему человека).

Антигенсвязывающие полипептиды могут быть получены способами, хорошо известными специалисту. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомной технологии путем слияния B-клетки, продуцирующей специфические антитела, с миеломной клеткой (злокачественное B-клеточное новообразование), выбранной по способности расти в культуре тканей и отсутствию синтеза цепей антител (Köhler and Milstein, 1975, Nature 256(5517): 495-497 и Nelson et al., 2000 (Jun), Mol Pathol. 53(3):111-7, полностью включенные в данный документ посредством ссылки).

Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, можно, например, получить путем:

a) иммортализации лимфоцитов, полученных из периферической крови животного (включая человека), ранее иммунизированного/ подверженного воздействию определенным антигеном, с помощью иммортализованной клетки и предпочтительно миеломных клеток с целью образования гибридомы,

b) культивирования полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и

выделения клеток, продуцирующих антитела, имеющие желаемую специфичность.

Моноклональные антитела можно получить с помощью способа, включающего следующие стадии:

a) клонирование в векторы, особенно в фаги и, в частности, в нитчатые бактериофаги, последовательности ДНК или кДНК, полученные из лимфоцитов, особенно лимфоцитов периферической крови животного (предпочтительно предварительно иммунизированных определенными антигенами),

b) трансформация прокариотических клеток указанными выше векторами в условиях, позволяющих продуцировать антитела,

c) селекция антител путем их отбора по аффинности к антигену,

d) выделение антител, имеющих желаемую специфичность

e) экспрессия кодирующих антитела молекул нуклеиновых кислот, полученных из B-клеток пациентов, подвергшихся воздействию антигенов, или животных, экспериментально иммунизированных антигенами.

Затем выбранные антитела можно получить с использованием общепринятой технологии получения рекомбинантных белков (например, из генетически сконструированных клеток CHO).

Изобретение относится к выделенному антигенсвязывающему полипептиду, который является иммуноспецифическим для полипептида по изобретению. Предпочтительно, антигенсвязывающий полипептид представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий полипептид связан с цитотоксическим фрагментом. Примеры цитотоксических фрагментов включают домен Fc антитела, который рекрутирует клетки, несущие Fc-рецептор, способствуя АЗКЦ. Альтернативно, антигенсвязывающий полипептид может быть связан с биологическим токсином или цитотоксическим химическим веществом.

Другой важный класс антигенсвязывающих полипептидов включает молекулы, полученные из Т-клеточного рецептора (ТКР), которые связываются с представляемыми HLA фрагментами антигенов по данному изобретению. В данном варианте осуществления биологические препараты на основе ТКР (включая ТКР, полученные непосредственно от пациентов или специфически модифицированные, высокоаффинные ТКР), которые распознают CLT-антигены (или их производные) на поверхности опухолевых клеток, могут также включать нацеливающий фрагмент, который распознает компонент на Т-клетке (или другой класс иммунных клеток), который привлекает эти иммунные клетки к опухолям, обеспечивая терапевтический эффект. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент может также стимулировать полезную активность (включая цитолитическую активность) перенаправленных иммунных клеток.

Таким образом, в одном варианте осуществления антигенсвязывающий полипептид является иммуноспецифическим для HLA-связанного полипептида, который представляет собой полипептид по изобретению или является его частью. Например,

антигенсвязывающий полипептид представляет собой Т-клеточный рецептор.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий полипептид по изобретению может быть связан с другим полипептидом, который способен связываться с цитотоксическими клетками или другими иммунными компонентами у субъекта.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий полипептид предназначен для применения в медицине.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий полипептид по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такая композиция может быть стерильной композицией, подходящей для парентерального введения. См., например, описание фармацевтических композиций выше.

В изобретении предложен способ лечения человека, страдающего злокачественного новообразования, при котором раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или для предотвращения злокачественного новообразования у человека, при котором раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, который включает введение указанному человеку антигенсвязывающего полипептида или композиции, содержащей указанный антигенсвязывающий полипептид по изобретению.

В одном варианте осуществления предложен антигенсвязывающий полипептид по изобретению, который может быть связан с цитотоксическим фрагментом, или композиция, содержащая указанный антигенсвязывающий полипептид по изобретению, для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них.

Предпочтительно, в любом из вышеупомянутых вариантов осуществления злокачественное новообразование представляет собой меланому, в частности, меланому кожи.

В одном варианте осуществления предложен способ или антигенсвязывающий полипептид, или композиция для применения согласно изобретению, причем полипептид содержит последовательность, выбранную из:

(a) последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10; и

(b) варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 и 76-77 и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33, 35, 36 или 40, или выбранной из любой из 41, 43, 44, 45 и 50;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

Антигенсвязывающие полипептиды (такие как антитела или их фрагменты, можно вводить в дозе, например, 5-1000 мг, например 25-500 мг, например, 100-300 мг, например, приблизительно 200 мг.

*Клеточная терапия для облегчения презентации антигена in vivo*

В фармацевтических композициях можно использовать любой из множества клеточных носителей для доставки для облегчения выработки антигенспецифического иммунного ответа. Таким образом, изобретение относится к клетке, которая представляет собой выделенную антигенпрезентирующую клетку, модифицированную загрузкой ex vivo полипептидом по изобретению или генетически сконструированную для экспрессии полипептида по изобретению (далее именуемую «АПК по изобретению»). Антигенпрезентирующие клетки (АПК), такие как дендритные клетки, макрофаги, В-клетки, моноциты и другие клетки, которые могут быть сконструированы как эффективные АПК. Такие клетки могут быть, но не обязательно, генетически модифицированы для увеличения способности презентировать антиген, для улучшения активации и/или поддержания Т-клеточного ответа, и/или могут быть иммунологически совместимыми с реципиентом (т. е. сходным гаплотипом HLA). АПК, как правило, могут быть выделены из любого множества биологических жидкостей и органов и могут быть аутологичными, аллогенными, сингенными или ксеногенными клетками.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения в качестве АПК используются дендритные клетки или их предшественники. Таким образом, в одном варианте осуществления АПК по изобретению представляет собой дендритную клетку. Дендритные клетки представляют собой высокоэффективными АПК (Banchereau & Steinman, 1998, Nature, 392:245-251), и было показано, что они эффективны в качестве физиологического адъюванта для выработки профилактического или терапевтического иммунитета (см. Timmerman & Levy, 1999, Ann. Rev. Med. 50:507-529). В общем, дендритные клетки можно идентифицировать на основе их типичной формы (звездчатые in situ, с заметными цитоплазматическими процессами (дендритами), видимыми in vitro), их способности захватывать, процессировать и презентовать антигены с высокой эффективностью и их способности активировать ответы наивных Т-клеток. Конечно, дендритные клетки могут быть сконструированы для экспрессии специфических рецепторов клеточной поверхности или лигандов, которые, как правило, не обнаруживаются на дендритных клетках in vivo или ex vivo, и такие модифицированные дендритные клетки рассматриваются в настоящем изобретении. В качестве альтернативы дендритным клеткам в составе иммуногенной композиции можно использовать секретируемые везикулы, нагруженные антигеном, (так называемые экзосомы) (см. Zitvogel et al., 1998, Nature Med. 4:594-600). Таким образом, в варианте осуществления предложена экзосома, нагруженная полипептидом по изобретению.

Дендритные клетки и предшественники могут быть получены из периферической крови, костного мозга, лимфатических узлов, селезенки, кожи, пуповинной крови или любой другой подходящей ткани или жидкости. Например, дендритные клетки можно

дифференцировать ex vivo путем добавления комбинации цитокинов, таких как ГМ-КСФ, ИЛ-4, ИЛ-13 и/или ФНОα, к культурам моноцитов, собранных из периферической крови. В качестве альтернативы, CD34-положительные клетки, собранные из периферической крови, пуповинной крови или костного мозга, могут быть дифференцированы в дендритные клетки путем добавления в культуральную среду комбинаций ГМ-КСФ, ИЛ-3, ФНО-α, лиганда CD40, ЛПС, лиганда flt3 и/или другого соединения(-й), которое индуцирует дифференцировку, созревание и пролиферацию дендритных клеток.

Дендритные клетки удобно разделить на «незрелые» и «зрелые» клетки, что позволяет легко различать два хорошо охарактеризованных фенотипа. Однако эту номенклатуру не следует толковать так, чтобы исключить все возможные промежуточные стадии дифференциации. Незрелые дендритные клетки характеризуются как АПК с высокой способностью захвата и процессинга антигена, что коррелирует с высокой экспрессией Fcγ-рецептора и рецептора маннозы. Зрелый фенотип, как правило, характеризуется более низкой экспрессией этих маркеров, но высокой экспрессией молекул клеточной поверхности, ответственных за активацию Т-клеток, таких как ГКГС класса I и класса II, молекул адгезии (например, CD54 и CD11) и костимулирующих молекул (например, CD40, CD80, CD86 и 4-1BB).

АПК также могут быть генетически модифицированы, например, трансфицированы полинуклеотидом, кодирующим белок (или его часть или другой вариант), таким образом, что полипептид экспрессируется на поверхности клетки. Такая трансфекция может осуществляться ex vivo, и затем можно использовать фармацевтическую композицию, содержащую такие трансфицированные клетки, как описано в данном документе. Альтернативно, пациенту может быть введен носитель для доставки гена, который нацелен на дендритную или другую антигенпрезентирующую клетку, что приводит к трансфекции, которая происходит in vivo. Например, трансфекцию дендритных клеток in vivo и ex vivo обычно можно проводить с использованием любых методов, известных в данной области техники, таких как методы, описанные в WO 97/24447, или метода генной пушки, описанного Mahvi et al., 1997, Immunology and Cell Biology 75:456-460. Загрузка антигеном дендритных клеток может быть достигнута путем инкубации дендритных клеток или клеток-предшественников с полипептидом, ДНК (например, плазмидным вектором) или РНК; или с рекомбинантными бактериями или вирусами, экспрессирующими антиген, (например, аденовирусом, аденоассоциированным вирусом (AAB) (например, AAV типа 5 и типа 2), альфавирусом (например, вирусом венесуэльского конского энцефалита (VEEV), вирусом Синдбис (SIN), вирусом леса Семлики (SFV), вирусом герпеса, аренавирусом (например, вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV)), вирусом кори, поксвирусом (например, модифицированным вирусом осповакцины Анкара (MVA) или вирусом оспы птиц), парамиксовирусом, лентивирусом или рабдовирусом (например, вирусом везикулярного стоматита (VSV)). Перед загрузкой полипептида, полипептиды могут быть ковалентно конъюгированы с иммунологическим партнером, который оказывает помощь Т-клеткам (например, с

молекулой-носителем). Альтернативно, дендритная клетка может активироваться неконъюгированным иммунологическим партнером, отдельно или в присутствии полипептида или вектора.

Изобретение обеспечивает доставку специально сконструированных коротких, химически синтезированных эпитоп-кодируемых фрагментов полипептидных антигенов в антигенпрезентирующие клетки. Специалисты в данной области техники поймут, что эти типы молекул, также известные как синтетические длинные пептиды (SLP), обеспечивают терапевтическую платформу для применения антигенных полипептидов по данному изобретению для стимуляции (или загрузки) клеток in vitro (Gornati et al., 2018, Front. Imm, 9:1484), или способ введения полипептидного антигена в антигенпрезентирующие клетки in vivo (Melief & van der Burg, 2008, Nat Rev Cancer, 8:351-60).

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенпрезентирующую клетку по изобретению, которая обычно представляет собой дендритную клетку, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такая композиция может быть стерильной композицией, подходящей для парентерального введения. См., например, описание фармацевтических композиций выше.

В одном варианте осуществления предложена антигенпрезентирующая клетка по изобретению, которая, как правило, представляет собой дендритную клетку, для применения в медицине.

Также предложен способ лечения человека, страдающего злокачественным новообразованием, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или для предотвращения злокачественного новообразования у человека, при котором раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, который включает введение указанному человеку указанной антигенпрезентирующий клетки по изобретению, которая предпочтительно является дендритной клеткой или композицией, содержащей указанную антигенпрезентирующую клетку по изобретению.

В одном варианте осуществления предложена антигенпрезентирующая клетка по изобретению, которая предпочтительно представляет собой дендритную клетку, или композицию, содержащую указанную антигенпрезентирующую клетку по изобретению, для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая экзосому по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такая композиция может быть стерильной композицией, подходящей для парентерального введения. См., например, описание фармацевтических композиций выше. Композиции могут необязательно содержать иммуностимуляторы - см. описание

иммуностимуляторов выше.

В одном варианте осуществления предложена экзосома по изобретению для применения в медицине.

Также предложен способ лечения человека, страдающего злокачественным новообразованием, при котором раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или предотвращения злокачественного новообразования у человека, при котором раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, который включает введение указанному человеку указанной экзосомы, если изобретение или композиция содержит указанную экзосому по изобретению.

В одном варианте осуществления предложена экзосома по изобретению или композиция, содержащая указанную экзосому по изобретению, для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления предпочтительным злокачественным новообразованием является меланома, в частности, меланома кожи.

*Терапия стимулированными Т-клетками*

В дополнение к АПК-опосредованному продуцированию in vivo или ex vivo Т-клеток, иммуноспецифических в отношении полипептидов по изобретению, аутологичные или неаутологичные Т-клетки могут быть выделены от субъекта, например, из периферической крови, пуповинной крови и/или с помощью афереза и стимуляции в присутствии ассоциированных с опухолью антигенов, которые загружены на молекулы ГКГС (сигнал 1) клеток АПК, чтобы индуцировать пролиферацию Т-клеток с ТКР-иммуноспецифическим для этого антигена.

Для успешной активации Т-клеток необходимо связывание костимулирующих поверхностных молекул B7 и CD28 с антигенпрезентирующими клетками и Т-клетками, соответственно (сигнал 2). Для достижения оптимальной активации Т-клеток требуются оба сигнала 1 и 2. И наоборот, стимуляция антигенным пептидом (сигнал 1) в отсутствие костимуляции (сигнал 2) не может вызвать полную активацию Т-клеток и может привести к Т-клеточной толерантности. Помимо костимулирующих молекул, существуют также ингибирующие молекулы, такие как CTLA-4 и PD-1, которые индуцируют сигналы для предотвращения активации Т-клеток.

Следовательно, аутологичные или неаутологичные Т-клетки могут быть стимулированы в присутствии полипептида по изобретению, размножены и перенесены обратно пациенту, подверженного риску или страдающего от злокачественного новообразования, раковые клетки которого экспрессируют соответствующий полипептид по изобретению, при условии, что антигенспецифические ТКР будут распознавать антиген, презентируемый ГКГС пациента, где они будут нацеливаться и вызывать

уничтожение клеток указанного злокачественного новообразования, которые экспрессируют указанный соответствующий полипептид.

В одном варианте осуществления предложен полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по изобретению для применения в стимуляции ex vivo и/или амплификации Т-клеток, полученных от человека, страдающего злокачественным новообразованием, для последующего повторного введения указанных стимулированных и/или амплифицированных Т-клеток указанному человеку для лечения указанного злокачественного новообразования у указанного человека.

В изобретении предложен способ лечения злокачественного новообразования у человека, при котором раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, который включает забор у указанного человека популяции лейкоцитов, содержащей по меньшей мере Т-клетки, необязательно с антигенпрезентирующими клетками, стимуляцию и/или амплификацию указанных Т-клеток в присутствии соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по изобретению, и повторное введение человеку некоторых или всех указанных лейкоцитов, содержащих по меньшей мере стимулированные и/или амплифицированные Т-клетки.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления предпочтительным злокачественным новообразованием является меланома, в частности, меланома кожи.

В одном варианте осуществления предложен способ для получения популяции Т-клеток, которая является цитотоксической для раковых клеток, которые экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, который включает (a) получение Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток от пациента со злокачественным новообразованием и (ii) стимуляцию и амплификацию популяции Т-клеток ex vivo с помощью соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по изобретению.

Под «соответствующими» в данном контексте подразумевается, что если раковые клетки экспрессируют, скажем, SEQ ID NO: A (A представляет собой одну из SEQ ID NO: 1-10) или ее вариант или иммуногенный фрагмент, тогда популяция Т-клеток стимулируется и амплифицируется ex vivo с помощью SEQ ID NO: A или ее вариант или иммуногенный фрагмент в форме полипептида, нуклеиновой кислоты или вектора, или композиции, содержащей одно из вышеперечисленного.

Например, в таких процессах культивирование и размножение осуществляют в присутствии дендритных клеток. Дендритные клетки можно трансфицировать молекулой нуклеиновой кислоты или вектором по изобретению и экспрессировать полипептид по изобретению.

Изобретение обеспечивает популяцию Т-клеток, которую можно получить с помощью любого из вышеупомянутых способов (в дальнейшем, популяция Т-клеток по изобретению).

В одном варианте осуществления предложена клетка, которая представляет собой

Т-клетку, которая была стимулирована полипептидом, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по изобретению (далее Т-клетка по изобретению).

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию Т-клеток или Т-клетку по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такая композиция может, например, представлять собой стерильную композицию, подходящую для парентерального введения.

В одном варианте осуществления предложена популяция Т-клеток или Т-клетка по изобретению для применения в медицине.

Также предложен способ лечения человека, страдающего злокачественным новообразованием, при котором раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или для предотвращения злокачественного новообразования у человека, при котором раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, который включает введение указанному человеку указанной популяции Т-клеток или Т-клетки по изобретению или композиции, содержащей указанную популяцию Т-клеток или Т-клетку по изобретению.

В одном варианте осуществления предложены популяция Т-клеток по изобретению, Т-клетка по изобретению или композиция, содержащая указанную популяцию Т-клеток или Т-клетку по изобретению, для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления предпочтительным злокачественным новообразованием является меланома, в частности, меланома кожи.

В одном варианте осуществления предложен способ или популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция для применения в соответствии с изобретением, причем полипептид содержит последовательность, выбранную из:

(a) последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10; и

(b) варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 и 76-77 и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33, 35, 36 или 40, или выбранной из любой из 41, 43, 44, 45 и 50;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

*Терапия сконструированными иммунными клетками*

Производные всех типов полипептидов, связывающих CLT-антигены, описанных выше, включая ТКР или миметики ТКР (см. Dubrovsky et al., 2016, Oncoimmunology),

которые распознают пептиды, производные от CLT-антигена, в комплексе с молекулами HLA человека, могут быть сконструированы для экспрессии на поверхности Т-клеток (аутологичных или неаутологичных), которые затем можно применять в качестве адоптивной Т-клеточной терапии для лечения злокачественного новообразования.

Эти производные подпадают под категорию «химерных антигенных рецепторов (CAR)», которые в контексте данного документа могут относиться к искусственным Т-клеточным рецепторам, химерным Т-клеточным рецепторам или химерным иммунорецепторам, например, и включают сконструированные рецепторы, которые прививают искусственную специфичность конкретной иммунной эффекторной клетке. CAR можно использовать для придания специфичности моноклонального антитела Т-клетке, тем самым позволяя генерировать большое количество специфических Т-клеток, например, для применения в адоптивной клеточной терапии. CAR могут направлять специфичность клетки к ассоциированному с опухолью антигену, полипептиду по изобретению, причем полипептид связан с HLA.

Другой подход к лечению злокачественного новообразования у пациента состоит в том, чтобы генетически модифицировать Т-клетки для нацеливания на антигены, экспрессируемые на опухолевых клетках, посредством экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR). Обзор этой технологии приведен в Wendell & June, 2017, Cell, 168: 724-740 (полностью включен посредством ссылки).

Такие CAR Т-клетки могут быть получены с помощью способа получения образца клеток от субъекта, например, из периферической крови, пуповинной крови и/или с помощью афереза, причем указанный образец содержит Т-клетки или предшественники Т-клеток, и трансфекции указанных клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей химерный Т-клеточный рецептор (CAR), который является иммуноспецифическим для полипептида по изобретению, при этом полипептид связан с HLA. Такая нуклеиновая кислота будет способна интегрироваться в геном клеток, и клетки можно вводить субъекту в эффективном количестве для обеспечения Т-клеточного ответа против клеток, экспрессирующих полипептид по изобретению. Например, от субъекта может быть взят образец клеток.

Понятно, что клетки, используемые для продуцирования указанных CAR-экспрессирующих Т-клеток, могут быть аутологичными или неаутологичными.

Трансгенные CAR-экспрессирующие Т-клетки могут иметь инактивированную экспрессию эндогенного Т-клеточного рецептора и/или эндогенного HLA. Например, клетки могут быть сконструированы для устранения экспрессии эндогенного альфа/бета Т-клеточного рецептора (TKP).

Методы трансфекции клеток хорошо известны в данной области техники, но можно использовать и высокоэффективные методы трансфекции, такие как электропорация. Например, нуклеиновые кислоты или векторы по изобретению, экспрессирующие конструкты CAR, могут быть введены в клетки с использованием аппарата для нуклеофекции.

Популяция CAR-экспрессирующих Т-клеток может быть обогащена после трансфекции клеток. Например, CAR-экспрессирующие клетки можно отделить от клеток, которые этого не делают (например, с помощью проточной цитометрии), путем использования антигена, связанного с CAR, или CAR-связывающего антитела. Альтернативно, стадия обогащения включает истощение не Т-клеток или истощение клеток, в которых отсутствует экспрессия CAR. Например, CD56+ клетки могут быть истощены из культуральной популяции.

Популяцию трансгенных CAR-экспрессирующих клеток можно культивировать ex vivo в среде, которая избирательно усиливает пролиферацию CAR-экспрессирующих Т-клеток. Следовательно, CAR-экспрессирующие Т-клетки могут быть размножены ex vivo.

Образец CAR клеток может быть сохранен (или может быть сохранен в культуре). Например, образец может быть заморожен для последующей экспансии или анализа.

CAR-экспрессирующие Т-клетки можно использовать в комбинации с другими терапевтическими средствами, например, с ингибиторами контрольных точек, включая антагонисты PD-L1.

В одном варианте осуществления предложена цитотоксическая клетка, которая была сконструирована для экспрессии любого из вышеуказанных антигенсвязывающих полипептидов на своей поверхности. Предпочтительно, цитотоксическая клетка представляет собой Т-клетку.

В одном варианте осуществления предложена цитотоксическая клетка, которая предпочтительно представляет собой Т-клетку, сконструированную для экспрессии любого из вышеуказанных антигенсвязывающих полипептидов на своей поверхности, для применения в медицине.

В изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая цитотоксическую клетку по изобретению, которая, как правило, представляет собой Т-клетку.

Предложен способ лечения пациента-человека, страдающего злокачественным новообразованием, при котором раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или для предотвращения злокачественного новообразования у человека, который может экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, причем способ включает введение указанному человеку цитотоксической клетки по изобретению, которая, как правило, представляет собой Т-клетку.

В одном варианте осуществления цитотоксическая клетка по изобретению, которая, как правило, представляет собой Т-клетку, предназначена для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них.

*Комбинированные терапии*

Способы лечения злокачественного новообразования по изобретению можно применять в комбинации с другими средствами для лечения, особенно ингибиторами контрольных точек и интерферонами.

Полипептиды, нуклеиновые кислоты, векторы, антигенсвязывающий полипептид и методы адоптивной клеточной терапии (на основе АПК и Т-клеток) могут использоваться в комбинации с другими компонентами, предназначенными для повышения их иммуногенности, например, для увеличения силы и/или широты вызываемого иммунного ответа или обеспечивают другие активности (например, активацию других аспектов врожденного или адаптивного иммунного ответа или разрушение опухолевых клеток).

Соответственно, изобретение обеспечивает композицию по изобретению (т.е. иммуногенную, вакцинную или фармацевтическую композицию) или набор из нескольких таких композиций, содержащих полипептид, нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем; и (i) один или более дополнительных иммуногенных или иммуностимулирующих полипептидов (например, интерфероны, ИЛ-12, молекулы блокады контрольных точек или кодирующие их нуклеиновые кислоты, или векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты), (ii) малые молекулы (например, ингибиторы HDAC или другие лекарственные средства, которые изменяют эпигенетический профиль раковых клеток) или биологические препараты (доставляемые в виде полипептидов или кодирующих их нуклеиновых кислот, или векторов, содержащих такие нуклеиновые кислоты), которые будут улучшать трансляцию и/или презентацию полипептидных продуктов, которые являются предметом данного изобретения.

Ингибиторы контрольных точек, которые блокируют нормальные белки на раковых клетках или белки на Т-клетках, которые на них реагируют, могут быть особенно важным классом лекарственных средств для комбинирования со средствами для лечения на основе CLT-антигена, поскольку эти ингибиторы стремятся преодолеть одну из основных защит злокачественного новообразования от атаки иммунной системы.

Таким образом, аспект изобретения включает введение полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора, антигенсвязывающего полипептида, композиции, Т-клетки, популяции Т-клеток или антигенпрезентирующей клетки по настоящему изобретению в комбинации с ингибитором контрольной точки. Примеры ингибиторов контрольной точки выбран из ингибиторов PD-1, таких как пембролизумаб (Keytruda) и ниволумаб (Opdivo), ингибиторов PD-L1, таких как атезолизумаб (Tecentriq), авелумаб (Bavencio) и дурвалумаб (Imfinzi) и ингибиторы CTLA-4, такие как ипилимумаб (Yervoy).

Интерфероны (например, альфа, бета и гамма) представляют собой семейство белков, которые организм вырабатывает в очень небольших количествах. Интерфероны могут замедлять или останавливать деление раковых клеток, снижать способность раковых клеток защищаться от иммунной системы и/или усиливать многие аспекты адаптивной иммунной системы. Интерфероны, как правило, вводят в виде подкожной инъекции, например, в бедро или живот.

Таким образом, аспект изобретения включает введение полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора, антигенсвязывающего полипептида или композиции по настоящему изобретению в комбинации с интерфероном, например, интерфероном-альфа.

Также можно комбинировать различные варианты осуществления изобретения, например, полипептиды, нуклеиновые кислоты и векторы по изобретению могут быть объединены с АПК, Т-клеткой или популяцией Т-клеток по изобретению (обсуждается ниже).

Один или несколько способов по изобретению также можно комбинировать с традиционной противораковой химиотерапией и/или облучением.

*Диагностирование*

В другом аспекте изобретение относится к способам применения одного или более полипептидов или нуклеиновой кислоты по изобретению для диагностирования злокачественного новообразования, в частности, меланомы, например, меланомы кожи или для диагностирования людей, подходящих для лечения полипептидами, нуклеиновыми кислотами, векторами, антигенсвязывающими полипептидами, адоптивными клеточными терапиями или композициями по настоящему изобретению.

Таким образом, изобретение обеспечивает способ диагностирования того, что человек страдает злокачественным новообразованием, включающий стадии: определения того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов или вариантов любой из них (например, выбранные из последовательностей SEQ ID NO: 11-32 и 51-78); или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную полипептидную последовательность (например, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 33-40 и SEQ ID NO: 41-50), и диагностирования указанного человека как страдающего от злокачественного новообразования, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируются в указанных раковых клетках.

В изобретении предложен способ диагностирования того, что человек страдает от злокачественного новообразования, которое представляет собой меланомы кожи, включающий стадии: определения того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 6, 7, 8 и 9 и их иммуногенных фрагментов или вариантов; или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную полипептидную последовательность, и диагностирования указанного человека как страдающего от злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируется в указанных раковых клетках.

В контексте данного документа термин «сверхэкспрессия» в раковых клетках означает, что уровень экспрессии в раковых клетках выше, чем в нормальных клетках.

В изобретении предложен способ диагностирования того, что человек страдает от

злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, включающий следующие стадии: определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, и 10, и иммуногенных фрагментов или вариантов любой из них; или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную полипептидную последовательность, и диагностирования указанного человека как страдающего от злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируется в указанных раковых клетках.

Сверхэкспрессию можно определить по отношению к уровню нуклеиновой кислоты или полипептида по изобретению у контрольного субъекта-человека, о котором известно, что он не болен злокачественным новообразованием. Таким образом, сверхэкспрессия указывает на то, что нуклеиновая кислота или полипептид по изобретению обнаруживается на значительно более высоком уровне (например, уровне, который на 30%, 50%, 100% или 500% выше) у испытуемого субъекта, чем у контрольного субъекта. В случае, если контрольный субъект-человек имеет неопределяемый уровень нуклеиновой кислоты или полипептида по изобретению, тогда диагноз может быть поставлен путем обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида по изобретению.

В изобретении также предлагается способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, включающий следующие стадии:

(a) определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов или вариантов любой из них (например, выбранные из последовательностей SEQ ID NO: 11-32 и 51-78), или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный полипептид (например, выбранный из последовательностей SEQ ID NO: 33-40 и 41-50); и если это так

(b) введение указанному человеку соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора, композиции, популяции Т-клеток, Т-клетки, антигенпрезентирующей клетки, антигенсвязывающего полипептида или цитотоксической клетки по изобретению.

Также предложено применение полипептида, содержащего последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1-10; или

варианта последовательностей из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (a), выделенной из опухоли человека, страдающего злокачественным новообразованием, или применение нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, в качестве биомаркера для определения того, подходит ли указанный человек для лечения вакциной, содержащей соответствующий полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор, композицию, популяцию Т-

клеток, Т-клетку, антигенпрезентирующую клетку, антигенсвязывающий полипептид или цитотоксическую клетку по изобретению.

Предпочтительно, злокачественное новообразование представляет собой меланому, в частности, меланому кожи.

Изобретение также относится к способу или применению согласно изобретению, причем полипептид содержит последовательность, выбранную из:

(a) последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10; и

(b) варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 и 76-77 и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33, 35, 36 или 40, или выбранной из любой из 41, 43, 44, 45 и 50;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

Предпочтительно, полипептид по изобретению имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, или ее фрагмент, такой как ее иммуногенный фрагмент (например, выбранный из последовательностей SEQ ID NO: 11-32 и 51-78).

Предпочтительно, нуклеиновая кислота по изобретению имеет или содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 33-40 или 41-50, или ее фрагмент, такой как ее иммуногенный фрагмент.

Наборы для обнаружения присутствия нуклеиновых кислот хорошо известны. Например, наборы, содержащие по меньшей мере два олигонуклеотида, которые гибридизуются с полинуклеотидом, можно использовать в ПЦР-реакции в режиме реального времен (ПЦР-РВ), чтобы обеспечить обнаружение и полуколичественное определение нуклеиновых кислот. Такие наборы могут обеспечить обнаружение продуктов ПЦР путем генерации флуоресцентного сигнала в результате Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) (например, наборы TaqMan®) или при связывании двухцепочечной ДНК (например, наборы SYBR® Green). Некоторые наборы (например, те, которые содержат зонды TaqMan®, которые охватывают экзоны целевой ДНК) позволяют обнаруживать и количественно определять мРНК, например, транскрипты, кодирующие нуклеиновые кислоты по изобретению. Анализы с использованием определенных наборов могут быть настроены в мультиплексном формате для одновременного обнаружения нескольких нуклеиновых кислот в реакции. Также можно использовать наборы для обнаружения активной ДНК (а именно ДНК, которая несет определенные эпигенетические сигнатуры, указывающие на экспрессию). Дополнительные компоненты, которые могут присутствовать в таких наборах, включают диагностический реагент или репортер для облегчения обнаружения нуклеиновой кислоты по изобретению.

Нуклеиновые кислоты по изобретению также можно обнаружить с помощью

жидкой биопсии, используя образец крови пациента. Такая процедура представляет собой неинвазивную альтернативу хирургической биопсии. Плазма из таких образцов крови может быть выделена и проанализирована на наличие нуклеиновых кислот по изобретению.

Полипептиды по изобретению могут быть обнаружены с помощью антигенспецифических антител в анализе типа ИФА для обнаружения полипептидов по изобретению в гомогенизированных препаратах образцов опухоли пациента. Альтернативно, полипептиды по изобретению могут быть обнаружены с помощью иммуногистохимических анализов, которые идентифицируют присутствие полипептидных антигенов с помощью световой микроскопии для исследования срезов образцов опухоли пациента, которые были окрашены с использованием соответственно препаратов меченых антител. В качестве дополнительной альтернативы, полипептиды по изобретению могут быть обнаружены с помощью иммуногистохимических анализов, которые идентифицируют присутствие полипептидных антигенов с помощью световой микроскопии для исследования срезов образцов опухоли пациента, которые были окрашены с использованием соответственно препаратов меченых антител.

Полипептиды по изобретению также можно обнаружить, определив, способны ли они стимулировать Т-клетки, индуцированные против указанного полипептида.

Клетки злокачественного новообразования или опухоли, например меланомы, например, меланомы кожи, могут быть, например, получены из биоптата злокачественного новообразования, например, меланомы, например, меланомы кожи.

Способ лечения злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи у человека включает (i) обнаружение присутствия нуклеиновой кислоты или полипептида согласно изобретению и (ii) введение субъекту нуклеиновой кислоты, полипептида, вектора, клетки, Т-клеток или популяции Т-клеток или композицию согласно изобретению (и предпочтительно введение той же самой нуклеиновой кислоты или полипептида, или их фрагмента, который был обнаружен).

Способ лечения злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи у человека также включает введение субъекту нуклеиновой кислоты, полипептида, вектора, клетки, Т-клетки или популяции Т-клеток или композиции согласно изобретению, у которого было обнаружено присутствие (и предпочтительно такой же) нуклеиновой кислоты или полипептида согласно изобретению.

В частности, злокачественное новообразование, которое необходимо диагностировать и при необходимости лечить, представляет собой меланому, например, меланому кожи.

Если обнаружен полипептид по изобретению с SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 или 10, или его фрагмент, тогда злокачественное новообразование может представлять собой меланому кожи или увеальную меланому.

*Конкретные варианты осуществления изобретения*

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 1. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 11-14. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат две, три или четыре из SEQ ID NO: 11-14. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 55-57 или 73-74. Дополнительные иллюстративные фрагменты включают все SEQ ID NO: 11-14, 55-57 и 73-74 (учитывается возможное перекрытие последовательностей, так что любая перекрывающаяся последовательность не должна присутствовать более одного раза). Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 41. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи или увеальной меланомы. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 2. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 58-66, 75 и 78. Дополнительные иллюстративные фрагменты включают все SEQ ID NO: 15-16, 58-66, 75 и 78 (учитывается возможное перекрытие последовательностей, так что любая перекрывающаяся последовательность не должна присутствовать более одного раза). Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 42. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 3. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 53 и 67-69. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 53. Дополнительные

иллюстративные фрагменты включают все SEQ ID NO: 17-18, 53 и 67-69 (учитывается возможное перекрытие последовательностей, так что любая перекрывающаяся последовательность не должна присутствовать более одного раза). Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 43. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи или увеальной меланомы. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 4. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из SEQ ID NO: 19. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат или состоят из SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат или состоят из SEQ ID NO: 54. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 70-72 и 76-77. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат SEQ ID NO: 19 и либо SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52. Дополнительные иллюстративные фрагменты содержат SEQ ID NO: 54 и либо SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52. Дополнительные иллюстративные фрагменты включают все SEQ ID NO: 19, 51-52, 54, 70-72 и 76-77 (учитывается возможное перекрытие последовательностей, так что любая перекрывающаяся последовательность не должна присутствовать более одного раза). Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 44. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи или увеальной меланомы. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 5. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 20-22. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 45. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие

полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи или увеальной меланомы. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 6. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 46. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 7. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из SEQ ID NO: 25. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 47. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 8. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из SEQ ID NO: 26. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 48. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно

меланомы, например, меланомы кожи. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 9. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 27-29. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 49. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи. Также предложены связанные способы диагностирования.

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 10. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 30-32. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 50. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи или увеальной меланомы. Также предложены связанные способы диагностирования.

**Примеры**

Пример 1. Идентификация CLT

Цель состояла в том, чтобы идентифицировать специфические для злокачественного новообразования транскрипты, которые полностью или частично состоят из ДКП-элементов.

В качестве первого шага мы de novo собрали комплексный пан-раковый транскриптом. Для достижения этого прочтения последовательностей РНК от 768 образцов пациентов, полученных из проекта Атласа ракового генома (TCGA) и представляющих широкий спектр типов злокачественных новообразований (24 сбалансированных в гендерном отношении образца от каждого из 32 типов злокачественных новообразований (31 первичная и 1 метастатическая меланома); таблица S1), были использованы для направляемой геномом сборки. Сбалансированные в гендерном отношении образцы (за исключением гендер-специфических тканей) были обрезаны по адаптеру и качеству (Q20) и отфильтрованы по длине (оба прочтения пары

≥35 нуклеотидов) с использованием программы cutadapt (v1.13) (Marcel M., 2011, EMBnet J., 17:3) и нормированы по к-меру (k=20) с использованием к-меров (v2.0) (Crusoe et al., 2015, F1000Res., 4:900) для максимальной и минимальной глубины 200 и 3, соответственно. Считывания были сопоставлены с GRCh38 с помощью STAR (2.5.2b) с настройками, идентичными тем, которые используются в TCGA, и переданы в Trinity (v2.2.0) (Trinity, Grabherr, M.G., et al., 2011, Nat. Biotechnol., 29:644-52) для сборки под геномом с отключенной встроенной нормализацией глубины in silico. Большинство способов сборки было выполнены на 32-ядерных узлах высокопроизводительной вычислительной системы с 256 ГБ ОЗУ, при этом неудавшиеся процессы повторно запускались с использованием узлов с 1,5 ТБ ОЗУ. Полученные контиги были подвергнуты поли(А)-триммированию (trimpoly в SeqClean v110222) и энтропийной фильтрации (≥0,7) для удаления некачественных и артефактных контигов (bbduk в BBMap v36.2). Для каждого типа злокачественного новообразования исходные 24 образца были квази-картированы на очищенную сборку с использованием Salmon (v0.8.2 или v0.9.2) (Patro, R., et al., 2017, Nat. Methods, 14:417-419), с обнаруженными контигами, экспрессируемыми при удалении <0,1 транскриптов на миллион (TPM). Оставшиеся были картированы на GRCh38 с использованием GMAP (v161107) (Wu et al., 2005, Bioinf., 21:1859-1875), и контиги, которые не были выровнены с ≥85% идентичности, более ≥85% их длины были удалены из сборки. Наконец, сборки для всех типов злокачественного новообразования вместе были упорядочены и объединены в самые длинные непрерывные транскрипты с использованием gffread (Cufflinks v2.2.1) (Trapnell et al., 2010, Nat. Biotech., 28:511-515). Поскольку этот способ сборки был специально разработан для оценки повторяющихся элементов, моноэкзонные транскрипты были сохранены, но помечены. Полноту и качество сборки транскриптов оценивали путем сравнения с GENCODE v24basic и MiTranscriptome1 (Iyer et al. 2015, Nat. Genet., 47: 199-208). Мы составили перечень уникальных сайтов сплайсинга, представленных в GENCODE, и проверили, присутствует ли сайт сплайсинга в сборке транскриптома в пределах 2-нуклеотидного окна отсрочки. Этот способ привел к идентификации 1001931 транскрипта, 771006 из которых были сплайсированы и 230925 моноэкзонных.

Отдельно на собранные контиги накладывали на аннотацию последовательности геномных повторов для идентификации транскриптов, содержащих ДКП-элемент. ДКП-элементы и не-ДКП-элементы были аннотированы, как описано ранее (Attig et al., 2017, Front. In Microbiol., 8:2489). Вкратце, скрытые модели Маркова (HMM), представляющие известные семейства человеческих повторов (библиотека Dfam 2.0 v150923), были использованы для аннотирования GRCh38 с помощью RepeatMasker Open-3.0 (Smit, A., R. Hubley, and P. Green, http://www.repeatmasker.org, 1996-2010), сконфигурированного с помощью nhmmer (Wheeler et al., 2013, Bioinform., 29:2487-2489). Сканирование на основе HMM повышает точность аннотации по сравнению со способами на основе BLAST (Hubley et al., 2016, Nuc. Acid. Res., 44:81-89). RepeatMasker аннотирует ДКП и внутренние области отдельно, поэтому табличные выходные данные были проанализированы для

объединения смежных аннотаций для одного и того же элемента. Этот способ дал 181967 транскриптов, которые содержали один или более, полный или частичный ДКП-элемент.

Транскрипты на миллион (TPM) определяли для всех транскриптов с использованием Salmon, а экспрессию в пределах каждого типа злокачественного новообразования сравнивали с экспрессией в 811 образцах здоровой ткани (контрольные образцы здоровой ткани для всех типов злокачественного новообразования, если таковые имеются, от TCGA и, отдельно от GTEx (The Genotype-Tissue Expression Consortium, 2015, Science, 348:648-60). Считалось, что транскрипты экспрессируются конкретно при злокачественном новообразовании, если обнаружено более 1 TPM в любом образце, и как специфические для злокачественного новообразования, если выполнялись следующие критерии: i, экспрессировались в ≥6 из 24 образцов каждого типа злокачественного новообразования; ii, экспрессировались при <10 TPM в ≥90% всех образцов здоровой ткани; iii, экспрессировались при представляющем интерес типе злокачественного новообразовании в ≥3× медианы экспрессии для любого типа контрольной ткани; и iv, экспрессировались при представляющем интерес типе злокачественного новообразования ≥3× 90-го процентиля для соответствующей здоровой ткани, если таковой имеется. В дополнение к этим пороговым уровням экспрессии, отбор транскриптов был основан на проверке вручную, исключая потенциально неправильно собранные контиги или транскрипты с ДКП-элементами в их 3'-нетранслируемых областях (НТО). Если направление транскрипции не могло быть однозначно определено, учитывались транскрипты, соответствующие обеим цепям.

Перечень транскриптов, специфических для злокачественного новообразования, затем пересекался с перечнем транскриптов, содержащих полные или частичные ДКП-элементы, чтобы получить перечень из 5923 транскриптов, которые удовлетворяли обоим критериям (обозначаются как CLT для специфических для злокачественного новообразования транскриптов, охватывающих ДКП-элементы).

Чтобы идентифицировать CLT с потенциалом кодирования белка, мы запускаем алгоритм прогнозирования ОРС, основанный на длине и соответствии баллов дикодона (гексамера). HMM была обучена на гексамерах, полученных из последовательностей Ensembl CDS, и были взяты открытые рамки считывания с ≥300 нуклеотидов, где их балл для смыслового гексамера превышал балл для антисмыслового гексамера. Этот фильтр идентифицировал 885 CLT, потенциально кодирующих белок длиной по меньшей мере 99 аминокислот.

Для идентификации уникальных белковых последовательностей, потенциально кодируемых CLT, последовательности, транслируемые с наибольшей ОРС выбранных CLT, сравнивали с последовательностями, транслируемыми со всех ОРС ≥210 нуклеотидов из полной сборки транскриптов, с использованием tblastn (BLAST+v2.3.0) без мягкой маскировки. Были сохранены только CLT без совпадений или с совпадениями со значением E> $10^{-5}$.

Чтобы еще больше убедиться в специфичности раковых антигенов, кодируемых

CLT, мы исследовали их потенциальную перекрестную реактивность с другими белками, которые могут экспрессироваться в здоровой ткани. С этой целью сохраняли транслируемые ОРС с <85% идентичности аминокислотной последовательности (по всей длине белка) с любым другим спрогнозированным белком. Для тех белков, кодируемых CLT, демонстрирующих> 85% идентичности последовательности с одним или более спрогнозированными белками, мы исследовали профиль экспрессии транскриптов, кодирующих подобные белки. Если эти дополнительные транскрипты также экспрессировались специфическим для злокачественного новообразования способом (на основе критериев, перечисленных выше), соответствующий CLT сохранялся в перечне отобранных кандидатов. Если дополнительные транскрипты также экспрессировались в здоровой ткани, соответствующий CLT удаляли. Комбинация этих критериев отбора дала окончательный перечень из 139 CLT, способных кодировать белки с достаточно уникальной аминокислотной последовательностью.

Из этих 139 CLT 14 были специфическими для меланомы кожи (т.е. было обнаружено, что их экспрессия была специфически повышена в образцах меланомы кожи в TGCA в соответствии с вышеуказанной методологией) и 7 были специфичными для меланомы кожи и увеальной меланомы (т.е. было обнаружено, что их экспрессия была специфически повышена для меланомы кожи и увеальной меланомы в TGCA в соответствии с вышеуказанной методологией). Четыре из этих CLT, специфических для меланомы кожи, идентифицированы в данном документе как имеющие SEQ ID NO: 34, 37, 38 и 39. Четыре из этих CLT, специфических для меланомы кожи и увеальной меланомы, идентифицированы в данном документе как имеющие SEQ ID NO: 33, 35, 36 и 40.

Пример 2. Иммунопептидомный анализ

Иммунопептидомный анализ представляет собой мощную технологию, которая позволяет напрямую обнаруживать специфические пептиды, связанные с молекулами HLA в клетках или тканях. Методика состоит из аффинной очистки молекул HLA из биологических образцов, а затем элюирования связанных пептидов из молекул HLA и оценки пептидов с помощью масс-спектрометра с нано-ультраэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (nUPLC-$MS^2$) (Freudenmann et al., 2018, Immunology 154(3):331-345). Масс-спектры (МС), полученные этим способом, можно использовать для точной идентификации коротких пептидов, которые связаны с молекулами HLA класса I и HLA класса II. Программное обеспечение, используемое для спектральной интерпретации и идентификации последовательностей, зависит от наличия заранее определенного перечня белковых последовательностей для спектрального сопоставления. Хотя можно искать данные МС, используя предварительно определенные перечни, соответствующие всем открытым рамкам считывания (ОРС), полученным из известного транскриптома, или даже всего генома (Nesvizhskii et al., 2014, Nat. Methods 11: 1114-1125), изучение этих очень больших баз данных последовательностей приводит к очень высокому уровню ложного обнаружения, что ограничивает идентификацию представленных пептидов.

Дополнительные технические вопросы (например, масса лейцина=масса изолейцина) и теоретические вопросы (например, сплайсинг пептидов (Liepe, et al., 2016, Science 354(6310): 354-358)) увеличивают ограничения, связанные с использованием очень больших баз данных, например, созданных на основе известного транскриптома или всего генома. Таким образом, на практике исключительно сложно выполнить иммунопептидомный анализ для идентификации новых антигенов без ссылки на четко определенный набор потенциальных полипептидных последовательностей.

Bassani-Sternberg et al. (Bassani-Sternberg et al., 2016, Nature Commun., 7: 13404) изучили данные МС, полученные от образцов HLA-связанных пептидов, полученных от 25 пациентов с меланомой кожи, в отношении полипептидов, описанных для всего протеома человека. Эти анализы выявили сотни тысяч пептидов, соответствующих известным человеческим белкам. Как и ожидалось, эти пептиды включали пептиды, обнаруженные в составе множества опухолеассоциированных антигенов (TAA), включая PRAME, MAGEA3 и TRPM1 (меластатин). Кроме того, данные МС от 5 из этих пациентов были изучены с помощью перечня полипептидов, созданного из специфических для пациента мутированных последовательностей белков, обнаруженных геномным анализом этих 5 пациентов, выявив специфические для пациента неоантигены, презентируемые на молекулах HLA класса I и HLA класса II этих пациентов.

Многие из спрогнозированных полипептидных последовательностей (ОРС), полученных из 139 CLT, упомянутых в Примере 1, не содержатся в протеоме человека. Применяя подробные знания об иммунопептидомной оценке, изобретатели изучили файлы необработанных данных Bassani-Sternberg et al. (ссылка на базу данных: https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894) с этим набором новых потенциальных последовательностей CLT-антигена.

Для выполнения этого анализа пептидные последовательности из всех возможных ОРС, кодируемых каждым CLT, были объединены в один пептидный файл для каждого CLT или нет, и эти объединенные файлы (анализ А) или отдельные пептидные файлы (анализ В) были использованы для исследования необработанных спектров в наборе данных PXD004894 вместе со всеми полипептидами, обнаруженными в протеоме человека (UniProt (анализ А) или UniProt и masDB (анализ В)), с помощью программного обеспечения Peaks™ (анализ А) или программного обеспечения Mascot (анализ В).

В анализе А результаты этих исследований выявили 14 пептидов, которые были связаны с молекулами HLA класса I, иммунопреципитированными из образцов опухолей от 25 пациентов, обследованных Bassani-Sternberg и др., которые можно отнести к 8 ОРС, которые не были обнаружены в опубликованном протеоме (см. таблицу 1). В анализе В результаты этих исследований идентифицировали 14 пептидов, которые были связаны с молекулами HLA класса I или молекулами HLA класса II, иммунопреципитированными из образцов опухолей у 25 пациентов, обследованных Bassani-Sternberg и др., которые можно отнести к 7 ОРС, которые не были обнаружены в опубликованном протеоме (см. таблицу 2). Обнаружение этих пептидов, связанных с молекулами HLA класса I и HLA класса II у

указанных пациентов, подтверждает, что 10 открытых рамок считывания, из которых они были получены (таблицы 1 и 2, SEQ ID NO: 1-10), транслировались в ткани меланомы и были презентованы иммунной системе в комплексе с молекулами HLA класса I или HLA класса II. На основании этого полипептиды, кодируемые этими ОРС, были определены как CLT-антигены. В таблицах 1 и 2 показаны свойства пептидов, обнаруженных в CLT-антигенах, которых не было в базе данных UniProt. На Фиг. 1-32 представлены репрезентативные масс-спектры каждого из пептидов, представленных в таблице 1 и таблице 2. На фигурах показаны спектры фрагментов для указанных пептидных последовательностей, обнаруженные в опухолях SKCM отдельных пациентов с помощью nUPLC-$MS^2$ (от Bassani-Sternberg et al.; изображение, извлеченное из набора данных PRIDE программным обеспечением PEAKS). Все обнаруженные фрагменты указаны в пептидной последовательности над спектром, и наиболее распространенные ионы фрагментов указаны в каждом спектре. На Фиг. 1-15, 29-32 (анализ A), на нижней панели фигур показана аннотация последовательности к спрогнозированному спектру, тогда как аналогичные данные показаны в табличной форме в правой части Фиг. 16-28 (анализ B). Ионы фрагментов аннотированы следующим образом: b: ион N-концевого фрагмента; y: ион C-концевого фрагмента; -$H_2O$: потеря воды; -$NH_3$: потеря аммиака; [2+]: двухзарядный ион пептида; pre: нефрагментированный пептидный ион-предшественник.

Ряд пептидов, обнаруженных в связи с HLA класса I из таблиц 1 и 2, оценивали для определения прогнозируемой силы связывания с супертипами HLA класса I. В частности, все пептиды, ассоциированные с HLA класса I, указанные в таблице 3, которые состояли из 9 или более аминокислот, были исследованы с использованием программного обеспечения для прогнозирования NetMHC 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) для прогнозирования их связывания с супертипами типа A и B HLA класса I. Результаты этих прогностических исследований продемонстрировали, что все 11 пептидов (или 9-меры, производные от них), как было спрогнозировано, связываются по меньшей мере с одним из тестируемых супертипов (см. Таблицу 3). Среди них было спрогнозировано, что многие последовательности будут связываться с высокой достоверностью (низкая % ранговая оценка) с конкретными типами в пределах оцениваемых супертипов HLA класса I.

Взятые вместе, данные, представленные в таблицах 1-3 и на Фиг. 1-32, обеспечивают исключительно сильную поддержку презентации соответствующих CLT-антигенов у пациентов с меланомой.

В итоге: идентификация иммунопептидомных пептидов, полученных из спрогнозированных ОРС, демонстрирует, что эти CLT транслируются в полипептиды (SEQ ID NO: 1-10; называемые CLT-антигенами) в опухолевой ткани. Затем они процессируются аппаратом иммунного надзора за клетками и загружаются в молекулы HLA класса I или HLA класса II, что позволяет клетке подвергаться цитолизу Т-клетками, которые распознают полученные комплексы пептид/HLA класса I или пептид/HLA II класса. Таким образом, ожидается, что эти CLT-антигены и их фрагменты будут полезны

в различных терапевтических способах для лечения меланомы у пациентов, опухоли которых экспрессируют эти антигены.

Таблица 1. Перечень пептидов, идентифицированных иммунопептидомным анализом (анализ A) образцов опухоли SKCM, вместе с названием CLT-антигена и перекрестной ссылкой на SEQ ID NO.

| Пептидная последовательность[1] | Пептид, SEQ ID NO: | CLT-антиген, № | CLT-антиген, SEQ ID NO: | Пациент, №[2] | Масса пептида[3] | Длина пептида | Площадь[4] | Число спектров[5] | ч./млн[6] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VQQG WFFPR | SEQ ID NO: 11 | 1 | SEQ ID NO: 1 | Mel-3 | 1163,59 | 9 | 350000 | 1 | 9,4 |
| VVRGG AGFAA R | SEQ ID NO: 12 | 1 | SEQ ID NO: 1 | Mel-3 | 1059,59 | 11 | 3970000 | 8 | 5,1 |
| HLADR KLSL | SEQ ID NO: 13 | 1 | SEQ ID NO: 1 | Mel-5 | 1051,61 | 9 | 125000000 | 2 | -1,1 |
| HLADR KLSL | SEQ ID NO: 13 | 1 | SEQ ID NO: 1 | Mel-16 | 1051,61 | 9 | 3290000 | 30 | 5,1 |
| ADSLIL DF | SEQ ID NO: 15 | 2 | SEQ ID NO: 2 | Mel-26 | 892,45 | 8 | 83300 | 1 | 0,9 |
| SSFSTL ASLDK | SEQ ID NO: 16 | 2 | SEQ ID NO: 2 | Mel-20 | 1154,58 | 11 | 860000 | 2 | -6,7 |
| NTPNIV SLR | SEQ ID NO: 17 | 3 | SEQ ID NO: 3 | Mel-35 | 1012,57 | 9 | 4690000 | 2 | 3,8 |
| KTKGS LSVFR | SEQ ID NO: 19 | 4 | SEQ ID NO: 4 | Mel-3 | 1121,66 | 10 | 1200000 | 3 | 4,8 |
| AAFDR AVHF | SEQ ID NO: 51 | 4 | SEQ ID NO: 4 | Mel-40 | 1032,51 | 9 | 227000 | 1 | 0,3 |
| AAFDR AVHF | SEQ ID NO: 51 | 4 | SEQ ID NO: 4 | Mel-41 | 1032,514 | 9 | 8700000 | 3 | 7,8 |
| AFDRA VHF | SEQ ID NO: 52 | 4 | SEQ ID NO: 4 | Mel-27 | 961,4769 | 8 | 1240000 | 3 | 7,9 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AFDRA VHF | SEQ ID NO: 52 | 4 | SEQ ID NO: 4 | Mel-39 | 961,47 | 8 | 1940000 | 3 | 2,6 |
| DIPIKP W | SEQ ID NO: 21 | 5 | SEQ ID NO: 5 | Mel-5 | 867,49 | 7 | 1280000 | 5 | 5,3 |
| DIPIKP W | SEQ ID NO: 21 | 5 | SEQ ID NO: 5 | Mel-27 | 867,49 | 7 | 1790000 | 6 | 9,1 |
| RVADIP IKPW | SEQ ID NO: 20 | 5 | SEQ ID NO: 5 | Mel-5 | 1193,69 | 10 | 8710000 | 4 | 4,7 |
| RVADIP IKPW | SEQ ID NO: 20 | 5 | SEQ ID NO: 5 | Mel-27 | 1193,69 | 10 | 82000000 | 6 | 9,8 |
| RVADIP IKP | SEQ ID NO: 22 | 5 | SEQ ID NO: 5 | Mel-27 | 1007,61 | 9 | 30300000 | 6 | 8 |
| RSRDN FAVW | SEQ ID NO: 23 | 6 | SEQ ID NO: 6 | Mel-21 | 1149,57 | 9 | 21900000 | 4 | 8,5 |
| RSRDN FAVW | SEQ ID NO: 23 | 6 | SEQ ID NO: 6 | Mel-27 | 1149,57 | 9 | 19800000 | 6 | 7,8 |
| RSRDN FA | SEQ ID NO: 24 | 6 | SEQ ID NO: 6 | Mel-21 | 864,42 | 7 | 41000000 | 3 | 8,8 |
| RSRDN FA | SEQ ID NO: 24 | 6 | SEQ ID NO: 6 | Mel-27 | 864,42 | 7 | 2550000 | 3 | 7,9 |
| SPGISL VF | SEQ ID NO: 25 | 7 | SEQ ID NO: 7 | Mel-16 | 818,45 | 8 | 546000 | 1 | 8,3 |
| SSDSTI LVL | SEQ ID NO: 26 | 8 | SEQ ID NO: 8 | Mel-41 | 933,50 | 9 | 63600 | 1 | 13,1 |

[1] Пептид, идентифицированный при помощи масс-спектрометрии. Все пептиды представляют собой пептиды HLA класса I.

[2] Bassani-Sternberg et al, 2016, Nature Comm., 7: 13404

3 Расчетная масса пептида.

[4] Для программы Peaks™ площадь из масс-спектра; выбранные значения площади показаны для пептидов, для которых было получено более одного спектра.

[5] Число спектров, в которых был обнаружен пептид.

[6] Отклонение между наблюдаемой массой и расчетной массой; выбранные значения ч./млн показаны для пептидов, для которых было получено более одного спектра.

Таблица 2. Перечень пептидов, идентифицированных иммунопептидомным анализом (анализ B) в образцах опухоли SKCM, вместе с названием CLT-антигена и

перекрестной ссылкой на SEQ ID NO.

| Пептидная последовательность[1] | Пептид, SEQ ID NO: | CLT-антиген, № | CLT-антиген, SEQ ID NO: | Пациент, №[2] | Масса пептида[3] | Длина пептида | Число спектров[4] | Дельта масс[5] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HLADRKLSL | SEQ ID NO: 13 | 1 | SEQ ID NO: 1 | Mel-16 | 1051,61 | 9 | 3 | 0,01015 |
| VVRGGAGFAAR | SEQ ID NO: 12 | 1 | SEQ ID NO: 1 | Mel-3 | 1059,59 | 11 | 1 | 0,001564 |
| ARLQGSVTL | SEQ ID NO: 14 | 1 | SEQ ID NO: 1 | Mel-5 | 985,56 | 9 | 1 | 0,007816 |
| SSFSTLASLDK | SEQ ID NO: 16 | 2 | SEQ ID NO: 2 | Mel-20 | 1154,58 | 11 | 2 | 0,004607 |
| QPEVGIIPSVLLMRP* | SEQ ID NO: 18 | 3 | SEQ ID NO: 3 | Mel-18 | 1743,90 | 15 | 1 | -0,052238 |
| KTKGSLSVFR | SEQ ID NO: 19 | 4 | SEQ ID NO: 4 | Mel-3 | 1121,66 | 10 | 2 | 0,005258 |
| RVADIPIKPW | SEQ ID NO: 20 | 5 | SEQ ID NO: 5 | Mel-4 | 1193,69 | 10 | 1 | 0,009444 |
| RVADIPIKPW | SEQ ID NO: 20 | 5 | SEQ ID NO: 5 | Mel-5 | 1193,69 | 10 | 1 | 0,00549 |
| DIPIKPW | SEQ ID NO: 21 | 5 | SEQ ID NO: 5 | Mel-4 | 867,49 | 7 | 1 | 0,008214 |
| AGRMSKSLVIK | SEQ ID NO: 27 | 9 | SEQ ID NO: 9 | Mel-15 | 1188,70 | 11 | 3 | -0,000087 |
| PQSAGRM | SEQ ID NO: 28 | 9 | SEQ ID NO: 9 | Mel-6 | 745,35 | 7 | 1 | 0,007525 |
| AGSQSSSFTRGHTGETPQ* | SEQ ID NO: 29 | 9 | SEQ ID NO: 9 | Mel-10 | 1875,83 | 18 | 1 | 0,04998 |
| RSNLSIFL | SEQ ID | 10 | SEQ ID | Mel-4 | 990,55 | 8 | 2 | -0,005184 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NO: 30 | | NO: 10 | | | | | |
| FSLCLFTL | SEQ ID NO: 31 | 10 | SEQ ID NO: 10 | Mel-18 | 942,49 | 8 | 1 | -0,000214 |
| FSLCLFTL | SEQ ID NO: 31 | 10 | SEQ ID NO: 10 | Mel-15 | 942,49 | 8 | 13 | -0,0026 |
| SRRVFSRF SYMTFYS FRSYIKVF V* | SEQ ID NO: 32 | 10 | SEQ ID NO: 10 | Mel-7 | 3370,48 | 24 | 1 | 0,006099 |

[1] Пептид, идентифицированный при помощи масс-спектрометрии. Все пептиды представляют собой пептиды HLA класса I, если только они не обозначены * (такие относятся к HLA класса II)

[2] Bassani-Sternberg et al, 2016, Nature Comm., 7: 13404

[3] Расчетная масса пептида.

[4] Число спектров, в которых был обнаружен пептид.

[5] Разница между наблюдаемой массой и расчетной массой; выбранные значения дельты масс показаны для пептидов, для которых было получено более одного спектра.

* - обозначает пептид HLA класса II

Таблица 3. Прогнозируемое связывание NetMHC 4.0 пептидов, идентифицированных при помощи масс-спектрометрии (длина ≥ 9 остатков), с 12 аллелями супертипа HLA класса I (HLA-A0101, HLA-A0201, HLA-A0301, HLA-A2402, HLA-A2601, HLA-B0702, HLA-B0801, HLA-B1501, HLA-B2705, HLA-B3901, HLA-B4001, HLA-B5801) вместе с названием CLT-антигена и перекрестной ссылкой на SEQ ID NO.

| Спрогнозировано связывание 12 супертипов A и B человеческого HLA класса I[1] | Пептидная последовательность | Количество аллелей с ранговой оценкой <5,1%[2] | Количество аллелей с ранговой оценкой <2,1%[3] | Пептид, SEQ ID NO | CLT-антиген, № | Пациент, №[4] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Да | VQQGWFFPR | 2/12 | 1/12 | SEQ ID NO: 11 | 1 | Mel-3 |
| Да | VVRGGFAGFA AR | 3/12 | 0 | SEQ ID NO: 12 | 1 | Mel-3 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Да | HLADRKLSL | 6/12 | 3/12 | SEQ ID NO: 13 | 1 | Mel-5/Mel-16 |
| Да | ARLQGSVTL | 7/12 | 3/12 | SEQ ID NO: 14 | 1 | Mel-5 |
| Да | SSFSTLASLDK | 7/12 | 3/12 | SEQ ID NO: 16 | 2 | Mel-20 |
| Да | NTPNIVSLR | 1/12 | 1/12 | SEQ ID NO: 17 | 3 | Mel-35 |
| Да | KTKGSLSVFR | 4/12 | 2/12 | SEQ ID NO: 19 | 4 | Mel-3 |
| Да | AAFDRAVHF | 12/12 | 6/12 | SEQ ID NO: 51 | 4 | Mel-40/Mel-41 |
| Да | RVADIPIKPW | 1/12 | 1/12 | SEQ ID NO: 20 | 5 | Mel-4/Mel-5/Mel-27 |
| Да | RVADIPIKP | 0/12 | 0/12 | SEQ ID NO: 22 | 5 | Mel-27 |
| Да | RSRDNFAVW | 3/12 | 1/12 | SEQ ID NO: 23 | 6 | Mel-21/Mel-27 |
| Да | SSDSTILVL | 2/12 | 1/12 | SEQ ID NO: 26 | 8 | Mel-41 |
| Да | AGRMSKSLVIK | 4/12 | 4/12 | SEQ ID NO: 27 | 9 | Mel-15 |

[1] Прогнозируемое связывание с исследуемыми супертипами HLA класса I при любой ранговой оценке.

[2] Доля супертипов HLA класса I, которые, как было спрогнозировано, связывались с ранговой оценкой <5,1% (слабое связывание).

[3] Доля супертипов HLA класса I, которые, как было спрогнозировано, связывались с ранговой оценкой <2,1% (сильное связывание).

[4] Bassani-Sternberg et al, 2016, Nature Comm., 7: 13404

Пример 2.1. Дополнительный иммунопептидомный анализ

В дополнение к анализу, описанному в Примере 2, изобретатели также идентифицировали пептиды, полученные из спрогнозированных ОРС, посредством новых иммунопептидомных исследований. В этой дополнительной работе, описанной ниже, дополнительно продемонстрировано, что эти CLT транслируются в полипептиды CLT-антигена в опухолевой ткани.

Изобретатели получили замороженную ткань опухоли у 10 пациентов с диагнозом меланома. Образцы массой 0,05-1 г гомогенизировали, лизат центрифугировали на высокой скорости и очищенный лизат смешивали с гранулами протеина А (ProA), ковалентно связанными с моноклональным антителом к человеческому HLA класса I (W6/32).Смесь инкубировали в течение ночи при 4°C для улучшения связывания молекулы HLA класса I с антителом (Ternette et al., 2018 Proteomics 18, 1700465). Пептиды, связанные с HLA класса I, элюировали из антитела с использованием 10% уксусной кислоты, а затем пептиды отделяли от других высокомолекулярных компонентов с помощью колоночной хроматографии с обращенными фазами (Ternette et al., 2018). Очищенные, элюированные пептиды подвергали nUPLC-MS, а специфические пептиды с определенным отношением заряда к массе (m/z) отбирали в масс-спектрометре, выделяли, фрагментировали и подвергали MC/MC для выявления m/z полученных ионов

фрагментов (Ternette et al., 2018) с получением набора данных МС/МС, соответствующего иммунопептидому для каждого из этих образцов опухоли.

Применяя подробные знания об иммунопептидомной оценке, изобретатели исследовали спектры набора данных HLA класса I для 10 меланомных опухолей, подготовленных авторами с CLT-антигенами № 1, 2, 3 и 4 (Таблица 4; SEQ ID NO: 1-4), которые искали (для каждого CLT) вместе со всеми полипептидными последовательностями, обнаруженными в протеоме человека (UniProt), с использованием программного обеспечения PEAKS™ (v8.5 и vX, Bioinformatics Solutions Inc). Поскольку большинство HLA-связанных пептидов класса I, обнаруженных в клетках, происходят из конститутивно экспрессируемых белков, одновременное изучение этих баз данных с протеомом UniProt помогает убедиться в правильности отнесения наших последовательностей ОРС CLT к спектрам МС/МС.

Результаты этих исследований идентифицировали 8 индивидуальных пептидов (таблица 4; SEQ ID NO: 1-4), которые были связаны с молекулами HLA класса I, иммунопреципитированными из образцов опухоли из 10 образцов пациентов с меланомой, предоставленных авторами изобретения. Эти пептиды соответствовали аминокислотной последовательности ОРС, полученных из CLT, и не соответствовали полипептидным последовательностям, присутствующим в известном протеоме человека (UniProt). 2 из 8 пептидов, идентифицированных из CLT-антигенов SEQ ID NO: 1-4 (таблица 4) в наборе данных изобретателей, являются дополнением к 10 отдельным пептидам (из тех же CLT-антигенов SEQ ID NO: 1-4, указанных в Примере 2 и таблицах 1 и 2), которые были связаны с молекулами HLA класса I, иммунопреципитированными из образцов опухолей пациентов, обследованных Bassani-Sternberg et al.

Обнаружение этих пептидов, связанных с молекулами HLA класса I, подтверждает, что 4 ОРС, из которых они были получены, сначала транслировались в тканях меланомы, процессировались посредством пути HLA класса I и, наконец, презентовались иммунной системе в комплексе с молекулами HLA класса I. В таблице 4 показаны свойства пептидов, обнаруженных в CLT-антигенах. На Фиг. 33-42 показаны репрезентативные спектры МС/МС каждого из пептидов, представленных в таблице 4. На верхней панели каждой из этих фигур показан МС/МС профиль пептидных фрагментов со стандартными аннотациями МС/МС (b: ион N-концевого фрагмента; y: ион С-концевого фрагмента; -$H_2O$: потеря воды; -$NH_3$: потеря аммиака; [2+]: двухзарядный ион пептида; pre: нефрагментированный пептидный ион предшественника; $a_n$-n: ион внутреннего фрагмента), показанные над пиками наиболее распространенных ионов фрагментов, на изображении, извлеченном из набора данных изобретателей с помощью программного обеспечения PEAKS. На нижней панели каждой фигуры показана визуализация спектра, на которой показаны положения последовательностей линейных пептидов, которые были сопоставлены с ионами фрагментов. В соответствии с высокими оценками -10IgP, присвоенными пептидам в таблице 4, эти спектры содержат многочисленные фрагменты, которые точно соответствуют последовательностям пептидов (SEQ ID NO^ 12, 13, 16, 17,

19, 51, 53 и 54), которые мы обнаружили в этих анализах.

Все пептиды, обнаруженные в связи с HLA класса I из таблицы 4, которые имели длину не менее 9 а.к., были оценены для определения их прогнозируемой силы связывания с супертипами HLA класса I типа A и B с использованием программного обеспечения для прогнозирования NetMHCpan 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/). Результаты этих прогностических исследований продемонстрировали, что все пептиды (или 9-меры, содержащиеся в каждой полной последовательности), как было спрогнозировано, связываются с по меньшей мере одним из тестируемых супертипов (см. Таблицу 5). Среди них было спрогнозировано, что многие последовательности будут связываться с высокой достоверностью (низкая % ранговая оценка) с конкретными типами в пределах оцениваемых супертипов HLA класса I. Тот факт, что все обнаруженные пептиды, как ожидается, будут связываться с типами HLA, которые, как ожидается, будут в популяции пациентов, согласуется с их обнаружением. Более того, при помощи NetMHCpan 4.0 спрогнозировано, что каждый пептид, обнаруженный в образце опухоли из набора данных изобретателей, связывается с одним из типов HLA, которые мы обнаружили в образце пациента.

Для обеспечения дополнительной уверенности в правильности отнесения МС-спектров, полученных для опухолевой ткани, к пептидным последовательностям, которые мы обнаружили в Примере 2.1, пептиды с этими открытыми последовательностями были синтезированы и подвергнуты nUPLC-$MS^2$ с использованием тех же условий, которые применялись к образцам опухолей в данных изобретателей. Сравнение спектров для выбранных пептидов показано на Фиг. 43-50. На каждой фигуре верхний спектр соответствует образцу опухоли (из базы данных изобретателя по опухолевой ткани - Фиг. 33-42), а нижний спектр соответствует синтетически полученному пептиду той же последовательности. Выбранные значения m/z обнаруженных ионных фрагментов показаны над/под каждым пиком фрагмента в этих спектрах МС/МС. На фигурах показано точное выравнивание фрагментов (крошечные различия в экспериментально определенных значениях m/z между ионами фрагментов опухолевого и синтетического пептида находятся в пределах допусков по m/z <0,05 Дальтон), подтверждая правдивость соотнесения каждого из спектров, полученных из опухолевой ткани, пептидам, кодируемым CLT.

Взятые вместе, данные по пептидам, приведенные в таблице 4, на Фиг. 33-42 и Фиг. 43-50, обеспечивают исключительно сильную поддержку трансляции, процессингу и презентации соответствующих CLT-антигенов у пациентов с меланомой.

Чтобы дополнительно подтвердить специфичность этих CLT к злокачественному новообразованию, авторы изобретения обработали 37 образцов нормальной ткани (10 нормальных тканей кожи, 9 нормальных тканей легкого и 18 нормальных тканей молочной железы) и подготовили их для иммунопептидомного анализа. Авторы изобретения изучили спектры набора данных HLA-класса I из этих образцов нормальной ткани в поисках всех возможных пептидных последовательностей, полученных от

полипептидных последовательностей CLT-антигенов №№ 1, 2, 3 и 4. Никаких пептидов, полученных от CLT-антигенов №. 1, 2, 3 и 4, обнаружено в наборе образцов нормальной ткани не было (таблица 6), что является дополнительным подтверждением того, что CLT обладают специфической для злокачественного новообразования экспрессией.

В итоге: эта дополнительная идентификация иммунопептидомных пептидов, полученных из спрогнозированных ОРС, дополнительно демонстрирует, что эти CLT транслируются в полипептиды (SEQ ID NO: 1-4; называемые CLT-антигенами) в опухолевой ткани. Таким образом, ожидается, что эти CLT-антигены и их фрагменты будут полезны в различных терапевтических способах для лечения меланомы у пациентов, опухоли которых экспрессируют эти антигены.

Таблица 4. Перечень пептидов, идентифицированных дополнительными иммунопептидомными анализами образцов меланомной опухоли, вместе с названием CLT-антигена и перекрестной ссылкой на SEQ ID NO.

| Пептидная последовательность[1] | Пептид, SEQ ID NO: | CLT-антиген, №: | CLT-антиген, SEQ ID NO: | Пациент, №[2] | Масса пептида[3] | Длина пептида | Площадь 4 | Число спектров[5] | ч./млн[6] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HLADRKLSL | SEQ ID NO: 13 | 1 | SEQ ID NO: 1 | 2MT3 | 1051,61 | 9 | 154000 | 2 | -1,4 |
| HLADRKLSL | SEQ ID NO: 13 | 1 | SEQ ID NO: 1 | 2MT10 | 1051,61 | 9 | Н/О | 1 | 3,4 |
| VVRGGAGFAAR | SEQ ID NO: 12 | 1 | SEQ ID NO: 1 | 2MT3 | 1059,594 | 11 | 985000 | 6 | -0,9 |
| SSFSTLASLDK | SEQ ID NO: 16 | 2 | SEQ ID NO: 2 | 2MT4 | 1154,582 | 11 | 559000 | 1 | 0,9 |
| NTPNIVSLR | SEQ ID NO: 17 | 3 | SEQ ID NO: 3 | 2MT3 | 1012,567 | 9 | 884000 | 1 | -2,8 |
| RPLRIKGVF | SEQ ID NO: 53 | 3 | SEQ ID NO: 3 | 1MT1 | 1084,6869 | 9 | 19400000 | 7 | 0 |
| AAFDRAVH | SEQ ID NO: 51 | 4 | SEQ ID NO: 4 | 2MT3 | 1032,514 | 9 | Н/О | 1 | -1,3 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F | | | | | | | | | |
| KTKG SLSVF R | SEQ ID NO: 19 | 4 | SEQ ID NO: 4 | 2MT3 | 1121,6556 | 10 | 10100000 | 6 | -0,7 |
| KTKG SLSVF R | SEQ ID NO: 19 | 4 | SEQ ID NO: 4 | 2MT1 | 1121,6556 | 10 | 10100000 | 2 | -0,7 |
| KTKG SLSVF | SEQ ID NO: 54 | 4 | SEQ ID NO: 4 | 2MT12 | 965,555 | 9 | 4830000 | 1 | 1,2 |

H/O- не определено

[1] Пептиды HLA класса I, идентифицированные при помощи масс-спектрометрии.

[2] Набор данных изобретателей (1MT1, 1MT2, 1MT3, 2MT1, 2MT2, 2MT3, 2MT4, 2MT9, 2MT10, 2MT12).

[3] Расчетная масса пептида.

[4] Для программы PeaksTM площадь из масс-спектра; выбранные значения площади показаны для пептидов, для которых было получено более одного спектра.

[5] Число спектров, в которых был обнаружен пептид.

[6] Отклонение между наблюдаемой массой и расчетной массой; выбранные значения ч./млн показаны для пептидов, для которых было получено более одного спектра.

Таблица 5. Прогнозируемое связывание NetMHC 4.0 пептидов, идентифицированных при помощи масс-спектрометрии (длина > 9 остатков), с 12 аллелями супертипа HLA класса I (HLA-A0101, HLA-A0201, HLA-A0301, HLA-A2402, HLA-A2601, HLA-B0702, HLA-B0801, HLA-B1501, HLA-B2705, HLA-B3901, HLA-B4001, HLA-B5801) вместе с названием CLT-антигена и перекрестной ссылкой на SEQ ID NO.

| Спрогнозировано связывание 12 супертипов A и B человеческого HLA класса I[1] | Пептидная последовательность | Количество аллелей с ранговой оценкой <5,1%[2] | Количество аллелей с ранговой оценкой <2,1%[3] | Пептид, SEQ ID NO | CLT-антиген, № | Пациент, №[4] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Да | HLADRKLSL | 6/12 | 3/12 | SEQ ID NO:13 | 1 | 2MT3<br>2MT10 |
| Да | VVRGGFAGFAAR | 3/12 | 0 | SEQ ID NO:12 | 1 | 2MT3 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Да | SSFSTLASLDK | 7/12 | 3/12 | SEQ ID NO:16 | 2 | 2MT4 |
| Да | NTPNIVSLR | 1/12 | 1/12 | SEQ ID NO: 17 | 3 | 2MT3 |
| Да | RPLRIKGVF | 2/12 | 2/12 | SEQ ID NO: 53 | 3 | 2MT1 |
| Да | AAFDRAVHF | 12/12 | 6/12 | SEQ ID NO: 51 | 4 | 2MT3 |
| Да | KTKGSLSVFR | 4/12 | 2/12 | SEQ ID NO: 19 | 4 | 2MT1<br>2MT3 |
| Да | KTKGSLSVF | 7/12 | 4/12 | SEQ ID NO: 54 | 4 | 2MT12 |

[1] Прогнозируемое связывание с исследуемыми супертипами HLA класса I при любой ранговой оценке.

[2] Доля супертипов HLA класса I, которые, как было спрогнозировано, связывались с ранговой оценкой <5,1% (слабое связывание).

[3] Доля супертипов HLA класса I, которые, как было спрогнозировано, связывались с ранговой оценкой <2,1% (сильное связывание).

[4] База данных изобретателя (1MT1, 1MT2, 1MT3, 2MT1, 2MT2, 2MT3, 2MT4, 2MT9, 2MT10, 2MT12).

Таблица 6. Количество пептидов, полученных из CLT-антигенов с 1 по 4, в наборе образцов нормальной ткани.

| Антиген | Кожа | Легкое | Молочные железы |
|---|---|---|---|
| CLT-антиген 1 | 0/10 | 0/9 | 0/18 |
| CLT-антиген 2 | 0/10 | 0/9 | 0/18 |
| CLT-антиген 3 | 0/10 | 0/9 | 0/18 |
| CLT-антиген 4 | 0/10 | 0/9 | 0/18 |

Результаты, представленные в данном документе в Примерах 1, 2 и 2.1, полностью или частично основаны на данных, полученных в исследовательской сети Атласа ракового генома (TCGA) (http://cancergenome.nih.gov/); и проект по изучению экспрессии генов в различных тканях (GTEx) (при поддержке Общего фонда Офиса директора Национальных институтов здравоохранения, а также NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH и NINDS).

Пример 3. HERVFEST

Технологию функциональной экспансии специфических Т-клеток (FEST) использовали для идентификации терапевтически релевантных эпитопов опухолевого происхождения, присутствующих в репертуаре «ассоциированного с мутацией неоантигена» (MANA), обнаруженного в опухолевых клетках пациентов со злокачественным новообразованием, на основе обнаружения Т-клеток пациента, которые реагируют на эпитопы MANA (Anagnostou et al., Cancer Discovery 2017; Le et al., Science 2017; Forde et al., NEJM 2018; Danilova et al., Cancer Immunol. Res. 2018). Применение технологии FEST к CLT-антигенам, обнаруженным с помощью способов, описанных в Примерах 1, 2 и 2.1 (таблицы 1-6, фиг. 1-50), можно использовать для идентификации терапевтически релевантных Т-клеточных ответов на CLT-антигены у пациентов со

злокачественным новообразованием.

Как и другие анализы (например, ELISPOT) для идентификации эпитоп-специфических Т-клеток у субъекта, подвергшегося иммунному воздействию, технологии «FEST» получают свою специфичность путем активации/размножения родственных Т-клеток в культурах ex vivo, которые включают антигенпрезентирующие клетки и подходящие антигенные пептиды. Этот способ отличается от других иммунологических анализов тем, что в нем используется секвенирование нового поколения последовательностей ДНК Т-клеточного рецептора (ТКР), присутствующих в этих амплифицированных культурах (в частности: TCRseq, нацеленное на область CDR3 TCR-Vβ) для обнаружения специфических ТКР, которые амплифицируются в клетках, культивируемых с отдельными пептидами из панели целевых пептидов, полученных из антигена (или антигенов). Применение TCRseq к опухолевым тканям у того же пациента также можно использовать для демонстрации того, что если ТКР/Т-клетки, обнаруживаются ex vivo, то стимулированные пептидами культуры также присутствуют в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, обнаруженных в раковых тканях in situ. Таким образом, MANAFEST оказался мощной технологией для идентификации эпитопов MANA, которые распознаются Т-клетками пациента, позволяя идентифицировать функционально релевантные пептиды MANA среди множества мутантных пептидов, обнаруженных путем полноэкзомного секвенирования нормальных и опухолевых тканей злокачественных новообразованием (Le et al., Science 2017; Forde et al., NEJM 2018; Danilova et al., Cancer Immunol. Res. 2018; Smith et al., J Immunother Cancer 2019).

Применение методологии MANAFEST (Danilova et al., Cancer Immunol. Res. 2018) к CLT-антигенам осуществляли следующим образом. Способ, который мы будем называть HERVFEST, состоит из следующих стадий: стадия 1: пептиды, предположительно содержащие эпитопы, которые эффективно связывают выбранные аллели HLA класса I, были идентифицированы в CLT-антигенах. Стадия 2: МКПК от подходящих пациентов с меланомой были сопоставлены по типу HLA класса I с пептидной библиотекой, выбранной на стадии 1. Стадия 3: МКПК от этих пациентов были разделены на фракции Т-клеток и фракции клеток, отличных от Т-клеток. Клетки, отличные от Т-клеток, добавляли обратно к Т-клеткам пациента, а затем разделяли на 20-50 лунок (содержащих 250000 Т-клеток на культуру) и размножали с использованием различных факторов роста Т-клеток и отдельных синтетических пептидов, производных от CLT-антигена, (выбранных на стадии 1/2) в течение 10 суток. Стадия 4: TCRseq (секвенирование последовательностей CDR3 TCR-Vβ) выполняли во всех лунках и последовательности CDR3 TCR-Vβ, которые были амплифицированы в присутствии отдельных пептидов, полученных из CLT-антигена (но не амплифицированных в присутствии контрольных пептидов или в отсутствие пептидной стимуляции). Таким образом, присутствие амплифицированных последовательностей CDR3 TCR-Vβ в отдельных лунках анализа позволяет идентифицировать пептиды, производные от CLT-антигена, которые вызвали иммунный ответ у пациента с меланомой. Стадия 5: TCRseq также может быть выполнено

на образцах опухолей, чтобы определить, подвержены ли хомингу Т-клетки, несущие ТКР, амплифицированные CLT-антигеном, в опухоли пациента, обеспечивая дополнительные доказательства того, что Т-клетки, несущие эти ТКР, распознают пептиды, полученные из CLT-антигена, в опухоли пациента.

Анализы HERVFEST проводили с пептидами, полученными из CLT-антигенов 1-4 (SEQ ID NO: 1-4). Панель пептидов (см. Стадию 1 выше), использованная для этих исследований, была основана на прогнозах NetMHC для пептидов, полученных из CLT-антигена, которые, как было спрогнозировано, прочно связываются с 8 типами HLA класса I, как правило, обнаруживаемыми в образцах опухолей пациентов, доступных для нашего анализа. Пептиды, полученные из CLT-антигена, которые амплифицировали один или более ТКР в этих анализах HERVFEST, представлены в таблице 7. В таблице 7 также указан тип(ы) HLA класса I пептидов CLT-антигена, которые были протестированы на культурах, полученных из МКПК каждого пациента. Тип HLA класса I пациентов, МКПК которых были протестированы в этих исследованиях и для которых были амплифицированы один или более ТКР в анализах, приведен в таблице 8.

На панели A Фиг. 51 показаны опубликованные данные, демонстрирующие амплификацию ТКР с специфическими для пациента с НМРЛ пептидами MANA (Forde et al., NEJM 2018). На вертикальной оси показан преобладание каждой указанной последовательности CDR3 TCR-Vβ для лунок клеток, культивируемых в присутствии MANA или контрольных пептидов, перечисленных на горизонтальной оси. Амплификация в лунке, содержащей MANA7, демонстрирует, что репертуар Т-клеток пациента включает Т-клетки, которые являются реактивными к этому пептиду. На панелях B и C Фиг. 51 показаны репрезентативные данные амплификации ТКР из МКПК от 2 пациентов с меланомой, которые инкубировали в присутствии указанных пептидов CLT-антигена и контрольных пептидов. Как и в случае с панелью A, специфические амплификации, наблюдаемые на панелях B и C, демонстрируют, что репертуар Т-клеток этих пациентов с меланомой включает Т-клетки, которые являются реактивными к специфическим пептидам, полученным из CLT-антигена. На панели B показана частота ТКР, обнаруженных в лунке с LMSSFSTLASL-стимулированными МКПК от пациента с меланомой 222B во всех лунках, стимулированных панелью из 15 пептидов HLA класса I A*02 из CLT-антигенов 1, 2 и 4. Три последовательности ТКР были амплифицированы. LMSSFSTLASL (SEQ ID NO: 61) представляет собой связывающий пептид A*02, полученный из CLT-антигена 2. На панели C показана частота ТКР, обнаруженных в лунке с МКПК, стимулированными MVACRIKTFR, от пациента с меланомой 224B во всех лунках, стимулированных панелью из 15 пептидов HLA класса IA*02 из CLT-антигенов 1, 2 и 4 и 24 пептидов HLA класса IA*03 из CLT-антигенов 1, 2, 3 и 4. Была амплифицирована одна последовательность ТКР. MVACRIKTFR (SEQ ID NO: 64) представляет собой пептид, связывающий A*03, полученный из CLT-антигена 2.

Контрольные пептиды/условия, используемые в этих экспериментах, были следующими: CEF=смесь пептидов ЦМВ, ВЭБ и гриппа; SL9, TV9 и QK1=контрольные

пептиды ВИЧ-1; отсутствие пептида=культивирование в отсутствие пептида; исходный уровень=Т-клетки до культивирования.

На Фиг. 52 представлена сводка всех пептидов CLT-антигена для CLT-антигенов 1-4, которые амплифицировали один или более ТКР в исследованиях, проведенных с этими пациентами. На каждой панели отображаются аминокислотные последовательности CLT-антигенов 1-4, наложенные на пептиды, обнаруженные иммунопептидомным анализом (обозначены пунктирным, подчеркнутым или жирным шрифтом; см. Примеры 2 и 2.1). Под этими последовательностями отображаются пептиды, обнаруженные HERVFEST, (см. Фиг. 51) с номером пациента с меланомой, у которого они были обнаружены (таблица 8), и целевым типом HLA класса I.

Свойства каждого обнаружения HERVFEST определены следующим образом:

Простой текст: значительная амплификация одного ТКР

**Жирный текст:** значительная амплификация нескольких ТКР

*Подчеркнутый текст курсивом:* значительная амплификация одного ТКР, который был обнаружен в других лунках

**Подчеркнутый жирный текст:** значительная амплификация нескольких ТКР, по меньшей мере один из которых был обнаружен в других лунках

Эти результаты предоставляют убедительные доказательства того, что CLT-антигены 1-4 присутствуют у пациентов с меланомой и что пептиды, полученные из этих CLT-антигенов, вызывают специфические Т-клеточные ответы у этих пациентов с меланомой, подтверждая ценность этих CLT-антигенов в качестве мишеней для терапевтических вмешательств для лечения меланомы.

Таблица 7. Пептиды, полученные из CLT-антигена, которые амплифицировали один или более ТКР в анализах HERVFEST

| Эталонный CLT-антиген | SEQ ID NO | Пептидная последовательность | HLA класса I для пептида (спрогнозировано при помощи NetMHC) | Ссылка на панель HERVFEST |
|---|---|---|---|---|
| 1 | SEQ ID NO:55 | VPANTYNALK | HLA-A*03:01 | 37 |
| 1 | SEQ ID NO:56 | RLGGCQAWWR | HLA-A*03:01 | 41 |
| 1 | SEQ ID NO:57 | ANTYNALKSR | HLA-A*11:01 | 60 |
| 1 | SEQ ID NO:13 | HLADRKLSL | HLA-B*07:02 | 109 |
| 2 | SEQ ID NO:58 | LVTDMVACRI | HLA-A*01:01 | 8 |
| 2 | SEQ ID NO:59 | LILDFQPLQL | HLA-A*01:01 | 13 |
| 2 | SEQ ID NO:60 | MSSFSTLASL | HLA-A*01:01 | 15 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2 | SEQ ID NO:59 | LILDFQPLQL | HLA-A*02:01 | 25 |
| 2 | SEQ ID NO:61 | LMSSFSTLASL | HLA-A*02:01 | 27 |
| 2 | SEQ ID NO:62 | LMSSFSTLA | HLA-A*02:01 | 23 |
| 2 | SEQ ID NO:63 | QLMSSFSTLA | HLA-A*02:01 | 26 |
| 2 | SEQ ID NO:64 | MVACRIKTFR | HLA-A*03:01 | 46 |
| 2 | SEQ ID NO:16 | SSFSTLASLDK | HLA-A*03:01 | 45 |
| 2 | SEQ ID NO:64 | MVACRIKTFR | HLA-A*11:01 | 67 |
| 2 | SEQ ID NO:65 | VTDMVACRIK | HLA-A*11:01 | 69 |
| 2 | SEQ ID NO:66 | SPADSLIL | HLA-B*07:02 | 119 |
| 2 | SEQ ID NO:78 | SLILDFQPL | HLA-A*02:01 | 20 |
| 3 | SEQ ID NO:67 | NTPNIVSLRA | HLA-A*01:01 | 18 |
| 3 | SEQ ID NO:68 | VLLMRPLRIK | HLA-A*11:01 | 78 |
| 3 | SEQ ID NO:69 | MRPLRIKGVF | HLA-B*07:02 | 124 |
| 4 | SEQ ID NO:70 | FLFLELWL | HLA-A*02:01 | 30 |
| 4 | SEQ ID NO:71 | SVFRELHPA | HLA-A*02:01 | 29 |
| 4 | SEQ ID NO:72 | SPPSSTAPL | HLA-B*07:02 | 132 |

Таблица 8. Характеристики МКПК пациентов с меланомой, используемых в анализах HERVFEST

| Пациент | Аллель HLA A1 | Аллель HLA A2 | Аллель HLA B1 | Аллель HLA B2 | Аллель HLA C1 | Аллель HLA C2 | Целевые HLA в исследованиях HERVFEST |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 204B | A*01:01 | A*25:01 | B*03:01 | B*16:01 | C*07:01 | C*12:03 | A*01 |
| 222B | A*02:01 | A*30:02 | B*44:02 | Неизвестно | C*05:01 | B*18:01 | A*02 |
| 224B | A*02:01 | A*03:01 | B*35:01 | B*40:02 | C*04:01 | C*02:02 | A*02, A*03 |
| 293B | A*02:01 | A*30:01 | B*13:02 | B*44:02 | C*06:02 | C*05:01 | A*02 |
| 254C | A*11:01 | A*32:01 | B*15:01 | B*56:01/ 56:55 | C*01:02 | C*03:03 | A*11 |
| 188B | A*02:01 | A*11:0 | B8*7:02 | B*14:02 | C*07:02 | C*08:02 | A*11, |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | | | | B*07 |
| 271B | A*01:01 | A*01:01 | B*08:01 | B*08:01 | C*07:01 | C*07:01 | A*01 |
| 225B | A*02:01 | A*03:01 | B*07:02 | B*51:01 | C*07:02 | C*14:02 | A*03, B*07 |

Пример 4. Анализы для демонстрации высокоаффинных Т-клеток, специфических к CLT-антигенам, не были удалены из репертуара Т-клеток нормальных субъектов

Анализ методом ELISPOT может использоваться для демонстрации того, что CLT-антиген-специфические CD8 Т-клетки присутствуют в репертуаре нормальных Т-клеток здоровых людей и, таким образом, не были удалены центральной толерантностью из-за экспрессии специфических к злокачественному новообразованию CLT-антигенов в наивные ткани и ткани тимуса у этих пациентов. Этот тип анализа методом ELISPOT включает несколько стадий. Стадия 1: CD8 Т-клетки и CD14 моноциты могут быть выделены из периферической крови нормальных доноров крови, эти клетки типированы по HLA, чтобы соответствовать конкретным тестируемым CLT-антигенам. CD8 Т-клетки можно далее подразделить на наивные подтипы и подтипы памяти с использованием меченных магнитными частицами антител к маркеру памяти CD45RO. Стадия 2: CD14 моноциты обрабатывают отдельными или объединенными пептидами CLT-антигена в течение трех часов перед совместным культивированием с Т-клетками CD8 в течение 14 суток. Стадия 3: Размноженные CD8 Т-клетки выделяют из этих культур и повторно стимулируют в течение ночи свежими моноцитами, активированными с помощью пептидов. Эти пептиды могут включать; отдельные пептиды CLT-антигена, нерелевантные контрольные пептиды или пептиды, которые, как известно, вызывают устойчивый ответ на инфекционные (например, ЦМВ, ВЭБ, грипп, ВГС) или собственные (например, Mart-1) антигены. Повторную стимуляцию выполняют на планшетах, покрытых антителами к интерферону-гамма (ИФН-γ). Антитело захватывает любой ИФН-γ, секретируемый стимулированными пептидом Т-клетками. После активации в течение ночи клетки смывают с планшета, и ИФН-γ, захваченный на планшете, выявляют с помощью дополнительных антител к ИФН-γ и стандартных колориметрических красителей. Там, где клетки, продуцирующие ИФН-γ, изначально находились на планшете, остаются темные пятна. Данные, полученные в результате таких анализов, включают количество пятен, средний размер пятна и среднюю интенсивность пятна. Они представляют собой показатели частоты продуцирования Т-клетками ИФН-γ и количества ИФН-γ на клетку. Кроме того, показатель величины ответа на CLT-антиген может быть получен из индекса стимуляции (SI), который представляет собой специфический ответ, измеренный по количеству пятен или среднему размеру пятна, разделенному на фоновый ответ на моноциты без специфического пептида. Показатель силы стимуляции получается путем умножения индекса стимуляции для числа пятна на индекс стимуляции для интенсивности пятна. Таким образом, сравнения ответов на CLT-антигены и контрольные

антигены могут быть использованы для демонстрации того, что наивные субъекты содержат устойчивый репертуар реактивных к CLT-антигену Т-клеток, которые могут быть размножены путем вакцинации иммуногенными составами на основе CLT-антигена. В таблице 9 предложен перечень пептидов, полученных из CLT-антигена, которые индуцировали значительные CD8 Т-клеточные ответы от HLA-совместимых нормальных доноров крови. Результаты приведены на Фиг. 53-56. Горизонтальные линии представляют собой среднее значение данных. Статистическая значимость была измерена с помощью теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на повторные измерения. На Фиг. 53 показаны значимые CD8 Т-клеточные ответы от нормального донора крови на рестриктированные HLA-A*0201 пептиды из CLT-антигена 1 (CLT001 на фигуре). Пример, приведенный на Фиг. 54, демонстрирует CD8 ответы от нормального донора на пептид, полученный из CLT-антигена 2 (CLT002 на фигуре), также рестриктированного HLA-A*0201. На Фиг. 55 показаны значительные CD8 Т-клеточные ответы от нормального донора крови на рестриктированный HLA-A*0201 пептид из CLT-антигена 4 (CLT004 на фигуре). На Фиг. 56 показано отсутствие ответа на рестриктированные HLA-B*0702 пептиды из CLT-антигенов 1 и 4 (CLT001 и CLT004 на фигуре) в CD45RO-положительных CD8 Т-клетках памяти (панели A и C). Напротив, наивные CD45RO-отрицательные CD8 Т-клетки от того же донора в значительной степени отвечают на пептиды как из CLT001, так и из CLT004 (Фиг. 56, панели B и D).

Таблица 9. Пептиды, полученные от CLT-антигена, которые индуцировали значительные CD8 Т-клеточные ответы от HLA-совместимых нормальных доноров крови

| Эталонный CLT-антиген | SEQ ID NO | Пептидная последовательность | HLA-тип для пептида (спрогнозировано при помощи NetMHC) |
|---|---|---|---|
| 1 | SEQ ID NO: 73 | RLQGSVTLV | HLA-A*02:01 |
| 1 | SEQ ID NO: 74 | VPANTYNAL | HLA-B*07:02 |
| 2 | SEQ ID NO: 75 | QLMSSFSTL | HLA-A*02:01 |
| 4 | SEQ ID NO: 76 | FLELWLPEPML | HLA-A*02:01 |
| 4 | SEQ ID NO: 77 | APLLGSEPL | HLA-B*07:02 |

Пример 5. Окрашивание реактивных Т-клеток пентамерами пептида CLT-антигена

Присутствие и активность циркулирующих CD8 Т-клеток, специфических к CLT-антигенам, у здоровых доноров и пациентов с меланомой можно измерить с помощью окрашивания HLA класса I/пептид-пентамером («пентамер») и/или анализов уничтожения

in vitro. Таким образом, применение этих методологий к CLT-антигенам, обнаруженным с использованием способов, разъясненных в Примерах 1, 2 и 2.1 (таблицы 1-6, Фиг. 1-50), может быть использовано для демонстрации существования терапевтически релевантных Т-клеточных ответов на CLT-антигены у пациентов со злокачественным новообразованием.

Для этих исследований CD8 Т-клетки, выделенные из крови здорового донора или пациента, размножаются с использованием различных методов культивирования, например, микроскопических гранул, покрытых анти-CD3 и анти-CD28, с интерлейкином-2. Затем размноженные клетки можно окрашивать на предмет специфической реактивности их Т-клеточных рецепторов к CLT-антигену, используя пентамеры пептида CLT, которые состоят из пентамеров молекул HLA класса I, связанных с соответствующим пептидом CLT-антигена в пептид-связывающей бороздке молекулы HLA. Связывание измеряют путем обнаружения с помощью фрагментов конъюгированных с фикоэритрином или аллофикоцианином антител, специфических для мультимеризующего домена суперспирали структуры пентамера. Помимо окрашивания пентамером, можно исследовать другие поверхностные маркеры, такие как маркер памяти CD45RO и маркер лизосомального высвобождения CD107a. Связь положительности по пентамеру со специфическими поверхностными маркерами может быть использована для определения как количества, так и состояния (клеток памяти по сравнению с наивными/стволовыми клетками) популяций пентамер-реактивных Т-клеток.

Клетки, окрашенные пентамером, также можно отсортировать и очистить с использованием клеточного сортера с активацией флуоресценции (FACS). Затем отсортированные клетки могут быть дополнительно протестированы на их способность уничтожать клетки-мишени в анализах уничтожения in vitro. Эти анализы включают популяцию CD8 Т-клеток и популяцию флуоресцентно меченых клеток-мишеней. В этом случае популяция CD8 является или CLT-антиген-специфической, или отсортированной по пентамеру CD8 Т-клеток и специфической для антигена положительного контроля, который, как известно, индуцирует сильный ответ уничтожения, такой как Mart-1. Клетки-мишени для этих исследований могут включать активированные пептидом клетки T2, которые экспрессируют HLA-A*02, активированные пептидом клетки C1R, трансфицированные HLA-A*02,03 или B*07, или линии клеток меланомы, ранее приведенные как экспрессирующие CLT/CLT-антигены, или опухолевые клетки пациента. Пептиды, используемые для активации клеток T2 или C1R, включают пептиды CLT-антигена или пептиды положительного контроля. Клетки-мишени могут быть флуоресцентно помечены сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE, краситель для оценки пролиферации клеток), а на гибель указывает поглощение 7AAD. Таким образом, когда клетки-мишени погибают в результате апоптоза, опосредованного CD8 Т-клетками, они приобретают красную флуоресценцию и становятся дважды красными/зелеными положительными. Таким образом, применение таких анализов уничтожения к отсортированным по пентамерам, CLT-антиген-специфическим CD8 Т-

клеткам может быть использовано для определения цитотоксической активности CLT-антиген-специфических Т-клеток в ex vivo культурах Т-клеток пациентов с меланомой или здоровых доноров. На Фиг. 57 показано окрашивание пентамером HLA CD8 Т-клеток здоровых доноров с пептидами, полученными из CLT-антигенов 1, 2 и 4 (CLT001, CLT002 и CLT004 на фигуре). На Фиг. 58 показаны отсортированные с помощью пентамера CLT004 размноженные клетки, уничтожающие клетки-мишени C1R-B7, активированные CLT004. Значительное уничтожение активированных пептидом клеток C1R-B7 очевидно при соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней 3:1 и 1:1.

Пример 6. Исследования иммуногенности мышей

Чтобы продемонстрировать иммуногенность CLT-антигенов, мышей можно инокулировать дефектными по репликации аденовирусными векторами, экспрессирующими один или более CLT-антигенов, и Т-клетки, полученные от этих мышей, можно тестировать на наличие CLT-антиген-специфических Т-клеток с использованием анализов методом ELISPOT на IFNγ (Mennuni et al., Int.J.Cancer, 2005). Вкратце, мышей инокулируют рекомбинантными аденовирусами, экспрессирующими CLT-антиген, и в подходящий момент их подвергают гуманной эвтаназии, а препараты клеток селезенки загружают в лунки многолуночного планшета, дериватизированного моноклональными антителами к мышиному ИФН-γ, в присутствии (или отсутствие) перекрывающихся пептидов, соответствующих CLT-антигену. По прошествии подходящего времени иммобилизованный ИФНγ окрашивают другим моноклональным антителом, что позволяет определить количество клеток/пятен, которые затем сравнивают с общим количеством клеток, загруженных в лунку, для количественного определения реактивных к CLT-антигену Т-клеток.

Пример 7. Анализы для подтверждения экспрессии CLT в клетках меланомы

Подтверждение экспрессии CLT в линиях клеток меланомы с помощью количественной ПЦР-РВ

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (количественная ПЦР-РВ) представляет собой широко распространенный метод определения количества конкретного транскрипта, присутствующего в РНК, выделенной из данного биологического образца. Конкретные последовательности праймеров нуклеиновых кислот конструируют против представляющего интерес транскрипта, а область между праймерами впоследствии амплифицируют посредством серии термоциклических реакций и количественно определяют интенсивность флуоресценции с применением интеркалирующих красителей (SYBR Green). Пары праймеров были сконструированы против CLT и проанализированы против РНК, экстрагированной из линий клеток меланомы. Немеланомные линии клеток использовали в качестве отрицательного контроля. В частности, линии клеток меланомы COLO 829 (ссылка ATCC CRL-1974), MeWo (ссылка ATCC HTB-65), SH-4 (ссылка ATCC CRL-7724) и контрольные линии клеток HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома, ссылка ATCC HB-8065), Jurkat (Т-клеточный лейкоз, ссылка ATCC TIB152) и MCF7 (аденокарцинома, ссылка ATCC HTB-

22) были размножены in vitro, а РНК была извлечена из $1\times10^6$ мгновенно замороженных клеток и обратно транскрибирована в кДНК. Анализ методом количественной ПЦР-РВ с детекцией SYBR Green, следуя стандартным методикам, проводили с праймерами, разработанными против двух областей каждого CLT, и эталонными генами. Относительное количество (RQ) рассчитывали как:

RQ=2[Ct(ЭТАЛОН)-Ct(МИШЕНЬ)].

Результаты этих экспериментов представлены на Фиг. 59. На панели A показаны результаты анализа методом количественной ПЦР-РВ с двумя наборами праймеров (1+2 и 3+4), нацеленных на разные области CLT, кодирующие CLT-антиген 1 (SEQ ID 33), на РНК, экстрагированной из трех линий клеток меланомы и четырех немеланомных линий клеток. На панели B показаны результаты анализа методом количественной ПЦР-РВ с двумя наборами праймеров (5+6 и 7+8), нацеленных на разные области CLT, кодирующие CLT-антиген 2 (SEQ ID 34), на РНК, экстрагированной из трех линий клеток меланомы и четырех немеланомных линий клеток. На панели C показаны результаты анализа методом количественной ПЦР-РВ с двумя наборами праймеров (9+10 и 11+12), нацеленных на разные области CLT, кодирующие CLT-антигены 3/4 (SEQ ID 35), на РНК, экстрагированной из трех линий клеток меланомы и четырех немеланомных линий клеток. Эти результаты подтвердили специфическую экспрессию CLT в РНК, экстрагированной из линий клеток меланомы, по сравнению с немеланомными клетками. CLT были обнаружены в каждой из протестированных линий клеток меланомы.

Подтверждение экспрессии CLT в клетках меланомы in situ с помощью RNAScope

Методы гибридизации in situ (ISH) для анализа экспрессии транскрипта позволяют визуализировать присутствие и уровни экспрессии данного транскрипта в гистопатологическом контексте образца. Традиционные анализы ISH РНК включают распознавание молекул нативной РНК in situ с помощью олигонуклеотидных зондов, специфических для короткого участка желаемой последовательности РНК, которые визуализируются посредством сигнала, производимого комбинацией колориметрических реакций на основе антител или ферментов. RNAScope представляет собой недавно разработанный метод, основанный на гибридизации in situ с более продвинутой химией зонда, обеспечивающий специфичность производимого сигнала и позволяющий осуществлять чувствительную визуализацию одиночных молекул целевых транскриптов (Wang et al 2012 J Mol Diagn. 14(1): 22-29). Положительное окрашивание молекулы транскрипта проявляется в виде маленькой красной точки в данной клетке, при этом множество точек указывает на наличие множества транскриптов.

Зонды RNAScope были сконструированы против CLT и проанализированы на срезах 12 фиксированных формалином, залитых парафином биоптатов меланомной опухоли кожи. Оценку сигнала экспрессии проводили на репрезентативных изображениях каждого биоптата следующим образом:

Расчетный% клеток с положительным окрашиванием зонда CLT, округленный до ближайших 10

Предполагаемый уровень экспрессии на клетке в данном разделе:

0=отсутствие окрашивания

1=1-2 точки на клетку

2=2-6 точек на клетку

3=6-10 точек на клетку

4 = > 10 точек на клетку

Экспрессия каждого из CLT была обнаружена в нескольких биоптатах опухоли различных пациентов, независимо подтверждая обнаружение CLT из данных РНК-секвенирования, полученных для опухоли, и подтверждая гомогенность экспрессии в опухолевой ткани в определенных образцах, а также подчеркивая присутствие по меньшей мере одного CLT в каждом исследуемом биоптате пациента.

Таблица 10 - Оценка RNAScope в биоптатах тканей пациентов с меланомой

| | | CLT-антиген 1 (SEQ ID 33) | | CLT-антиген 2 (SEQ ID 34) | | CLT-антиген 3/4 (SEQ ID 35) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ткань | Биоптат | % положительных клеток | Балл | % положительных клеток | Балл | % положительных клеток | Балл |
| Меланома | 61 | 10 | 1 | 80 | 4 | 10 | 1 |
| Меланома | 62 | 80 | 2 | 80 | 2 | 100 | 4 |
| Меланома | 63 | 100 | 4 | 0 | 0 | 100 | 4 |
| Меланома | 64 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 3 |
| Меланома | 65 | 70 | 3 | 0 | 0 | 80 | 4 |
| Меланома | 66 | 100 | 3 | 50 | 2 | 90 | 3 |
| Меланома | 67 | 100 | 3 | 100 | 4 | 50 | 2 |
| Меланома | 68 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 3 |
| Меланома | 69 | 90 | 3 | 100 | 4 | 100 | 4 |
| Меланома | 70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 70 | 3 |
| Меланома | 71 | 0 | 0 | 0 | 0 | 80 | 4 |
| Меланома | 72 | 100 | 3 | 100 | 4 | 60 | 2 |

В тексте описания и следующей за ним формуле изобретения, если из контекста не следует иное, слово «содержать» и варианты, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как включение указанного целого числа, стадии, группы целых чисел, или группы стадий, но не исключение любого другого целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий.

Все патенты, заявки на патенты и ссылки, упомянутые в описании настоящего изобретения, полностью включены в данное описание посредством ссылки.

Изобретение охватывает все комбинации предпочтительных и более предпочтительных групп и подходящих и более подходящих групп и вариантов осуществления групп, перечисленных выше.

**ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

SEQ ID NO: 1 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 1)

MWNFFRRELTSNGFPENFSLDVPANTYNALKSRLCDPNADHTSCPSPCSLHAAG ALPGTGRQRWRVELAHLADRKLSLRDVSRLRQGGERRSGIAVKVVRGGAGFAARLQG SVTLVQQGWFFPRLGGCQAWWRMGAVVWCGELLTCTS

SEQ ID NO: 2 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 2)

MTGVLIRRGDLVTDMVACRIKTFRGHTEKAAICKTRKESSAETSPADSLILDFQPL QLMSSFSTLASLDK

SEQ ID NO: 3 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 3)

MNTPNIVSLRAHQPEVGIIPSVLLMRPLRIKGVFHHIHSPLHGENQGFTLCLQGAP PSSSV

SEQ ID NO: 4 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 4)

MAKTKGSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWLPEPMLSSSPPSSTAPLLGSEPLR HWEASLSR

SEQ ID NO: 5 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 5)

MKRKANRWRLSLRNGLLPSTPRATQQIPMEFLNSRVADIPIKPW

SEQ ID NO: 6 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 6)

MRGFLWRVETRGVEGSMRGPQKVLGNRLPGAGRNARSRDNFAVW

SEQ ID NO: 7 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 7)

MVYYGNPESSPGISLVFGLLRLDRMQPGFSVSQEGDPVGITDHLGC

SEQ ID NO: 8 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 8)

MPAQLKFTLQVNPATKMRVTLLSQPMETYEGDVLGVQTPYSSDSTILVL

SEQ ID NO: 9 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 9)

MGSSRVGERMMEEESRTGQKVNPGNTGKLFVGVGISRIAKVKYGECGQGFSDK SDVITHQRTHTGGKPYVCRECGRALAGSQTSSVTRGHTQGRSLMSAESVSGALAGSQSS SFTRGHTGETPQSAGRMSKSLVIKPYLNSHKKTNVITTHLHTPALRWLQRKSANPLHSPR V

SEQ ID NO: 10 (Полипептидная последовательность CLT-антигена 10)

MHSLQIFSLCLFTLLIVSFIVQKPFNLIRSNLSIFLLVEIAFEDLVMNYLPKLTSRRV FSRFSYMTFYSFRSYIKVFVSSQIDFFSLVKGRGPVQAHFSMWFCYSG

SEQ ID NO: 11 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)

VQQGWFFPR

SEQ ID NO: 12 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)

VVRGGAGFAAR

SEQ ID NO: 13 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)

HLADRKLSL
SEQ ID NO: 14 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)
ARLQGSVTL
SEQ ID NO: 15 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
ADSLILDF
SEQ ID NO: 16 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
SSFSTLASLDK
SEQ ID NO: 17 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 3)
NTPNIVSLR
SEQ ID NO: 18 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 3)
QPEVGIIPSVLLMRP
SEQ ID NO: 19 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)
KTKGSLSVFR
SEQ ID NO: 20 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 5)
RVADIPIKPW
SEQ ID NO: 21 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 5)
DIPIKPW
SEQ ID NO: 22 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 5)
RVADIPIKP
SEQ ID NO: 23 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 6)
RSRDNFAVW
SEQ ID NO: 24 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 6)
RSRDNFA
SEQ ID NO: 25 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 7)
SPGISLVF
SEQ ID NO: 26 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 8)
SSDSTILVL
SEQ ID NO: 27 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 9)
AGRMSKSLVIK
SEQ ID NO: 28 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 9)
PQSAGRM
SEQ ID NO: 29 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 9)
AGSQSSSFTRGHTGETPQ
SEQ ID NO: 30 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 10)
RSNLSIFL
SEQ ID NO: 31 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 10)
FSLCLFTL
SEQ ID NO: 32 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 10)
SRRVFSRFSYMTFYSFRSYIKVFV
SEQ ID NO: 33 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антиген 1)

CGGGGCCAGTCTTTCCCGTGCTATTCTCGTGATAGTGAATAAGTCTCACAAGA
TCTGATGGGTTTATCAGGGGTTTTCATTTTGCTTCTTCCTCATTTTCTTTTGCTGCTGT
AATGTAAGAAACGCCTTTTGCCTCCTGCCATAATTCTGAGGCCTCACAGCCATGTGG
AACTTCTTCAGGAGAGAATTAACATCCAATGGATTCCCAGAAAACTTTTCCCTCGAT
GTACCAGCAAACACCTACAATGCCCTGAAAAGCCGCCTCTGCGACCCCAATGCAGA
TCACACGTCCTGTCCCAGCCCCTGCAGCCTCCACGCGGCGGGTGCACTGCCAGGCAC
GGGAAGGCAGCGCTGGCGAGTAGAACTGGCCCATCTCGCAGATAGGAAGCTGAGCC
TCAGGGACGTTTCACGCCTTCGTCAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGATTGCCGTG
AAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGGTTTGCTGCCCGACTTCAGGGATCTGTCACCCT
CGTCCAGCAGGGTTGGTTCTTCCCGAGGCTGGGAGGATGCCAAGCCTGGTGGAGGA
TGGGGGCGGTGGTGTGGTGTGGGGAGCTTCTGACTTGCACATCCTGAGGGAACCTTC
TGCAGCTGATGTGTGAACTGGACCCCAGGCCGTGCCTCCGAGGAATCCCCAAGGCT
ATGGCCCCTCAGGTCCTGCTGGGGTGTTGGCCCCCACCTCTGCCTCAGAATGCAGGG
GTTCTGCAGGGAAGCCGCAGACCAGCCTGCTGCCTTGGGCCCTAGGGACACTGCAG
CCCCAGAAAGTACTGTGGGGGACAAAAGAGTTGTTTCTCGGGGGAGAAAACACCTG
TGAGGAAATGCAGGTGCCACAGAGGGAAATCCTCCTGGGGAGGAGGGTACCTGTTC
CATCCTCGGCCGACACGGGACTGCCTGGTGCCTGGTACCCACAGCCGCTACCTGCCG
CACGCATCTCTCCATGGTTTGCTAATTACTTCCATTAGTTTTAAACAAACTTGACAAG
AGACAGAAGGGTCCAGAGAGAAATTAAATCTAACTGTTTAAACATGT

SEQ ID NO: 34 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антиген 2)

CACCTCCATCACTGCGAATTATAATTCGACATGAGATTTGGGAGATGACACA
AAACCAAACCATATCAGTCTTTAAAGAGTTAAGTTAAAATAAGCTCTTTAAAGTGGG
CCCTAATCCAGTATGACTGGTGTTCTTATAAGAAGAGGAGATTTGGTCACAGACATG
GTTGCATGCAGAATAAAGACTTTTCGAGGACACACTGAGAAGGCAGCCATCTGCAA
AACAAGGAAAGAGTCCTCAGCAGAAACCAGTCCTGCAGACTCCTTGATCTTGGACT
TCCAGCCACTGCAATTGATGTCAAGCTTCAGCACCCTTGCATCTCTGGATAAATGAA
ATGTCACCCCAGCTGCCGTCCTTGTTCAGATCTGTGCAATAAAGAGCAAAGCATAAA
ACCAAGTCAAGGCTTTGAGGGAGTGACCTACAAAATGCATAATGTGAAACAATGCA
AAAGCGAAAGGTGCAAAATCCCCATCAAAGAGCTGGAGGCTGACAGATGCGCCAGT
GATAATTCCCATCTTCCAACACAGGAGCACAGCTTCCATTTTCCATAACAGAACAAC
AGCCAGAGCAGCTGGAAGGCAGGGCCGCATCCCAGACTTCCACCAACAATGGGATG
AGACTTGACATCTGGAATCACAACCACAACAGACCTGAGAGACCCACCAGCTTGAT
GACAAGCTTCTTCTTTCAAAGAAAGGTATCAGTCTGGGGGACCTAGTGCTGCAAACC
ATGACAAATTAAGTGTGGCATCCCTCACTTGCATAATGGAACTCAGTGATATTTTTT
AATTAACAAGAGTTATTTTTATGTAAGCTTCTCTCATTCCTCCACTGTGCGTGCTCGG
GGGCTGGTGGTGAGGAAAAAGAAAACAGCTGTGCGGGAAGCATCAAGAAAAGGCA
AGTCATGAAGTCTTAGAGATCAGTGACATGTAAGAAAAAGAGTGAGGAGAAAAAT
ATTCCTACTAAAGTTTTCCATTTGTTTACCTTCCTTGTCACATAGACTTCCAAGAGTT
AGAAGTCTAGGATTTGATCTCCAAATCTTCCTGGCAGATTACTCATCTTCATTTCATT
CATATAGTCCAGGGGTTTGTACAAAGGAAGATGCCAGTTCTTCCCCAATCATAACTA

AGATATCAAGAGATATTCTTTTGAAATGTAACAAAGGAGATCTGAAGTTCATCTGAA
AAAAATAAATGGTTTTAGGCGGTCATGACCATGGGATGCTGGACCAGGATGGTAAG
CTTCAGGAAACAGAATCTGGAGAATGCCCAGCTGCTCCCACAGGAAGCATCAGGGA
AGAAGAAGAAGAGGTGTGAAGTCTGCCTTCTGCTCTGCTGGGATCCCTTTCACATCT
CCTTTGCCTCCAGGCAGTTTTGGTTCCTGGCCATTTCCAGGTGTGACTCACTCAGGAT
GGTAAGCATCTTCTCTCCTACCCAGAGTAGAGGATGAAGACCTCATCTCAGAGGTTG
AAGGGAGCTCCAGAGAGAGGTCTCAAACTTCCAGCATTAACTGCTAAAGAAGCTTC
ATGAGCTGCTGGAGAACCTGGGAAATGACCAATTATAGGGACAGAGCTCAAATACT
CTGGGACACTCTAGTAGCTGAGAAAGTTCCAACTCCAGGGTGATAGAGGACTGCCT
GGCAAACCATCATCAAAGCAGAAGACCTGATACTAACATCACAGGCTATGGTTTAT
TACTGAAGATCAGTGCTTACACCCTGCCAGAGGTTCAGAAGCAAACTTATCATTGTT
CTCCCTGGAGATGTTGGCCCACATTCTGAAAAGTGTGGTCAGTAGTAGCAACAGAA
AGCAATTGTGCTTGCCAAGCACAATGTCACTGTCCCCAGCCCTTCCCCCAACACAAC
CCAGTAGGTGCTTCCTGGCTGCAAACTTGGGAAAGTCACTTGACCTGTCTGAGGTTC
CACTTCCTAATCTGGCCTGGCGAAGATAAGAAAAACAGTTTATTTAAAGTGTCTAGC
AAAGTGCTTGGACCAAAATAGGACCTCTGAAATGGTTATGGTAGTGCTGTTAAGGT
GATGTTTTAAGTGCTGATGAGCACAAAGATGGGTAAGATATTCCTTCTGTTAAAATC
TACAGTCTAATGAGAGAGAACAAGATGAATGCACAATAACTGTCATTCAGAACAGG
ATTATGAGAAGGTGTGAATTTCTGTGAAAAATCAGAACAGGGAGTAATATGATCCC
AGGTGATTGGCAGGGGGTGGGGGTCTGGATTCAACTGGAGAGGGAGCTGGCAGGG
AAGGCTTCCTGGAGGATGAGAGTTCAACAAGGGGCAGGTGTAGGATGTGGGTGGCC
AAGTGACTGGGCAGAAGGAGCTGCAGAAGTAAGACCCCAAATCAGGAAGACAAGG
GCCTGCTGAGAAACACGAGCTACAAAGTGCAAGTGCAGGAAGAGTTGGGATGAGAT
TAGAAGGGGGTCTGGGGCCAGACTGTGGAAGGCCCAAATGCCGGGCTAAGGAGTTT
GTACTTAATTCAGTGGTCAACGGGGAGTCATTGGAGGCTGTTGAGCAGGAGAGTTG
CTTTCTTTACAGCTGTGCCAGACTAAATTAAACCTAAACAGTACTTTATAGCTGGAA
AGGGAAGGCCCAGGAATAGCTCTTGACTCAGAAACAGGCATTGGGGAAGGTAATGA
GAAACAGCCGTGACTGATCAAAGCAGAGAGGTTAATTAAATTTGTAATTATTGTGA
AAGGCCATTAAAAACCCTAGTTCACTAGAGATAACTGCTCTAGTGGGGCTTCAAAG
ACAAACGCTTCTTTTAACCTTGAATAGGGGGATGTTTGCTTCTCTGTGGAGGAGATA
TGATTAAGATACTTAATAAATGGTAGATAAACA

SEQ ID NO: 35 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антигены 3 и 4)

AAACACACTAAGGGCTTTGTTATGGACTGAAATGTGTCCTCTCCCCAGAGTC
ACAGGATTATGAAGCCATAATCCTCAATGTGACTATATTTGGAGCAGGGGCCTTTAC
AGACATAATTAAATTAAATGAGGTCATAAGAGTGGGGCCCTAGTCTGATAGGACTG
GTGTCCTTACAAGAAGAGGGAGAGTCCTCAGAGAGTCCTCTCTCTCGGCATGGACA
CAAAAGAAAAGCCATGTGAGGACACAGAGAGAAGGTGGCTGTCTACGAGCTAGGA
AGAAAGGCCTCACCGGAAACCAACCCTCACAGCAGCTCCATCTTGGACTTCCAGCCT
CCGGAACTGTGAGAAAATAAATGTTTGCAATTCAGGTCGGTTGTATTTTGTGAAGGC
CATCCTAGCAAATGAATACTCCTAACATTGTCTCTTTAAGAGCTCACCAGCCTGAGG

TAGGAATCATTCCATCTGTGTTACTAATGAGACCGCTGAGGATCAAAGGGGTTTTCC
ACCACATCCACTCACCTCTACATGGCGAAAACCAAGGGTTCACTCTCTGTCTTCAGG
GAGCTCCACCCAGCAGCAGCGTTTGACAGAGCTGTTCACTTCCTCTTCCTGGAGCTG
TGGCTTCCAGAGCCCATGCTCAGCAGTTCCCCTCCTTCTTCGACTGCTCCTCTCTTAG
GCTCAGAGCCACTCAGACATTGGGAAGCAAGTTTGTCAAGATGACAGAGAACCGAG
GTAATGGATTCGAGTGATGAAACAGGAAGTTCATTCATGAGTTTTTGGCCACACCTC
CAAAGTGACGACTTAGCCAGAAATGGGATAACTGGGTTTCCCTACTTCTCTTTTATC
ATCCTCAATGAGAGTGACCAAATATTAGAGCTAGATGGAACCTTAGTGAAAATCTG
GCTACTCGTCCCGTCCCACCAGCCTGCCACCCATTTCAAGTTTGAAGAGACAAAGAC
ACATGGACCTTATGTAATTACTGGGGATTACCCCAGGAGTCTGTGGCAAAAGTCAGC
TTCTTCCCTCCCTGCTTCCCCGCCCTGTCTCTGGTACTTTCTACCAACACTGGGCTGTT
TCTGTGATCACACTTAAGCGTACCTAACCTGCGAATGCTGTATAGAAGGTGCTAATG
AACATGATTTAGCTTTAACACTCAGTTTTCTAAAGGGACACGTGGGGGCAGCAAATG
TTTAGGCAAAAACAATTCCAGTTCTAGCCTCTACTGTCTACATATGTGTATACATTTG
GGAAACGTTTGGGAAAGGGATATTTGAGAGCTTCTTTTTCTTTTTTGTGGTTTAGTTA
TTTGATGATATTGAGATTGTTTCTGAGCCATGTGCTTCAACATCGGATTGGGGATTTC
AGAAAAAGTTTTAGTCACTGTGATTCCATTTAGCTTCCAAATGTGTCTCTGCTAAGA
GACTTAAAAGCACTCATAAATAGCACGTGTGTCTTCTTTGCAGTGTTTGCTAATTTTG
AGTCACATCTTTTTAGAAAATCATGAGATTTGGTGTCACAGAGACTGGAATAAATAT
AGTCAAACTTATTGGTGAAGATTTCCTTTAGCTGTTTTCATAATCCATTTCCATTGTT
ATGATTATTGATGAATAAAACATTTTCTTTAGGTAGATACTTCTTTTTTCCCCCCACC
TTGATTTAATGTTTCCACTCTTATTGTCAAGTTTCTTATTACTCCCTAATAACTCTCAA
TAAAATAATGATTCCTGGGAGATTATTCCTGCTTTCCTACTATCACCTGTTGATTTGA
AAAGACAGAACAATACCGTAGAAGCTTCACTAATACATTGAAAGATAAAATGATAA
TACTAAATACTAAAATATGAAAAGTGATACTAAAAGTGGAGTCCTGGCACTAGTAT
TTTTTTTTTTGAGTCTTTAAATTTTATTTATTTATTTTTGAATTTTTTAAAATTATATGT
TATGTTCTGGGATACATGTGCAGAACGTGCAGGTTTGTTACATAGGTATACAGGTCT
GGCACTAGTATTTTGTTGCCACAAAATATCAAGCATGTATCCAAACTGCTCAAGACA
CATTAAAGACACAGGTAATCTGTAGGCATATTCAGGCTTGTAGTTTGCATTTTTTGG
TTTTCTTGTGGCTTTCAGTGCAAGTTGAGGTAATTCATGGGAAACAGTCACCAAAGA
AGTGCCAGTATTAGAAATCCAAGAGCCATTTCTCTAGCTTCTTCCAGAATCAAGACT
TTAGAGGTAATTTCTATCAACACTGGACATTTCCTGTCTGCAATTAACAATGAACAC
ATAGCATTATGTTTAATTGCAACCTGTTTAAAGCAGATTGGATGCTAAGGTTTAAGA
ACACTCTTCAGTCAAAAAGGTCTTTTAATCAGGTTTTTAATCTTGAGCACAATCTAG
GACACAGCATCATAGACTAACTCATTCGAGAATAGGTGTTGTCATCTAATCCTAACC
ACCCCCACCACCAACAAGCTGAATAGCTCTGGGCTCAGTATATACATTTGTACTGGG
CTCAGTACACACACCTAAGCTGGGTTCAGTATATGCCACTTTATAGTGAGAGGCATT
TTGTAATGAGAGCTCTGGGTTCACTATATACATTTGTACTGGGCTCA

SEQ ID NO: 36 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антиген 5)

GGGAGGGGGCCATGGCGGGGCCACTTCAAAGGAAAAGCTCTAGCTCCCCTAC

CTCTCTCACATCCTAAGGCTGCCTTTGTGGGATTCCACACAGAACAGCCTGGAAGCT
TGGGGCCCTGGCTTCCTTTTCTGGCCTGGGAGTCAGGTCATGGGGCCATCGCTTCAC
AGCAATCATGAGGGCCCAGGCCCAAGTGCTCACATGCTCCTCATGGGGACTGCTCCT
CTTAAAGGGTGGGCCCTCCTCACCCAGCTCCCTGCCCTGGCCAAGGAGGAGGCTGA
AAGAGCCTGAGCTGTGCCCTCTCCATTCCACTGCTGTGGCAGGGTCAGAAATCTTGG
ATAGAGAAAACCTTTTGCAAACGGGAATGTATCTTTGTAATTCCTAGCATGAAAGAC
TCTAACAGGTGTTGCTGTGGCCAGTTCACCAACCAGCATATCCCCCCTCTGCCAAGT
GCAACACCCAGCAAAAATGAAGAGGAAAGCAAACAGGTGGAGACTCAGCCTGAGA
AATGGTCTGTTGCCAAGCACACCCAGAGCTACCCAACAGATTCCTATGGAGTTCTTG
AATTCCAGGGTGGCGGATATTCCAATAAAGCCATGGTGAGAAAGGCATTCAGACAT
GGTGCCACTAGGATCACAGCTTTCATTGGCGGCCAGTCTCCCAGCCCCAAACTGCAG
ATACCTGGTCTTCTTCATGGCTGTGGCTCAATCTTCCTAGATATTTCATTGAAAAACC
AAGAGATATATCTGTGCACATGGCTTTTAGCCATGAGGCTTGGAAACTGGACACCAC
TGTAAAGAACATCTAGTGTCCCGTAAATCCATACCAAAGCTCTGAATCCACAAACCA
GGCTCTGGCCCAACCCTGCAAACACACTCCATTGCTCCATCTTCAGTAAAGGAAGAC
AAATTCATTTTTCTAATAACTGTGGACCTGCAGCCCCCTTAGATGTGTTGAGAGTCTT
TGGAAATATTTTCCTCTGAGGTCTGTCCACAGCTTCCCTGGGCCTGCGCTCAGCTGG
CCCGAGAAGGACCAAGGTCCCTCACATTTGCATGTAAACAGGGAGTGCCCTCTGCC
CTTCCAGTGAGCCCTGCCAGCGTGGGGGAGGCTTCAGCTCTGTGATCCGTTCCAGCT
CACTCTGAATTACACTCCTACATGCCCAGTCACAGACTTTTTGCAATTTCATTTTATT
TCACTGGCCCAACATCATTGTTAAAATAAAATTTAGCTGTGTTCCAAATGCTGCAAT
ATACAGTCTTCTGAAATGGCACCCTACATATTAGCCCAGACACAAAGAAGCAGTTTA
TAGGAGACAAGGCATCTGAGCATTATTAGCCTCCTCCTCACTTTGAAGAGGTCAAGT
TCATGGGTGGGCCCATGATCGCCTGACCCATTTACTCAACAACATCCTCATCCAACT
TCTTGGGCCACTGTTCTAGCTAAGCCAGCTTTGGAACCTATTCCTCCAACATTAGGA
TTGCCAGATAAAATACAGGACACCCAGTTATATTTGAACTTCAGACATACATTGGAT
AAATTTTCAGTACAAGTATGTCCCAAATATTGCATGATTTATTGCATTTAATAAAAA
TGTTGTACTGAAACATTTTTCATTGTTCCTCTAAAATTCAAATTTAACTGGGTGTCTT
GGTCTGTTTGGCTGCTATAACAAATTGCCTTAGGCTGGGGAATTTATAAACAACAGA
AATTTATTGCTCACATTTCTAGAGTCTGGGAGGCCCAAGATCAAGGTGCCAGCAGAT
TTGGTGCCTGGCGAGGGCCCATCCTCTGCTTCATAGATAGCACCTTCTTGCTGTGTCC
TCACATGGCAGAAGCAGAGAACAAGCTCTCTGAGTCCTC

SEQ ID NO: 37 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антиген 6)

CTTGGACTTCCCAGCCTCCAGAACTGTGAGAAATAAATTTTTGTTGTTTAATC
CATCCAGTCTGTGATATTTTGTTATGGCAGCTGAAGCAGTCAGGAAAGGATCCTCCC
CATCTCTGCAGAAGCCTGACCATCCCCCTAGAGGGCCTGGGAGGAAGTGGGTTTTGC
ATACAGTCCCTGTTGACTCTAGTGCCCCCTGCTGGCCCCAGACGCGAGTTCCGGCGA
GGCTTCAGGGTACAGCTCCCCCGCAGCCAGAAGCCGGGCCTGCAGCGCCTCAGCAC
CGCTCCGGGACACCCCACCCGCTTCCCAGGCGTGACCTGTCAACAGGTCTGTATTGG
CGACAAAAGGAGCAGCCCTGAATGTAGGGAAAGCAGGGCGGAGTCCTCTGCAGGCT

CGGGGGAGGGGAGGGGCGTGAATGCGTGGATTTCTGTGGAGAGTGGAAACACGGG
GAGTCGAGGGGAGCATGCGCGGGCCTCAGAAAGTTCTGGGAAACCGACTCCCGGGA
GCAGGGAGGAACGCGCGCTCCAGAGACAACTTCGCGGTGTGGTGAACTCTCTGAGG
AAAAACACGTGCGTGGCAACAAGTGACTGAGACCTAGAAATCCAAGCGTTGGAGGT
CCTGAGGCCAGCCTAAGTCGCTTCAAAATGGAACGAAGGCGTTTGTGGGGTTCCATT
CAGAGCCGATACATCAGCATGAGTGTGTGGACAAGCCCACGGAGACTTGTGGAGCT
GGCAGGGCAGAGCCTGCTGAAGGATGAGGCCCTGGCCATTGCCGCCCTGGAGTTGC
TGCCCAGGGAGCTCTTCCCGCCACTCTTCATGGCAGCCTTTGACGGGAGACACAGCC
AGACCCTGAAGGCAATGGTGCAGGCCTGGCCCTTCACCTGCCTCCCTCTGGGAGTGC
TGATGAAGGGACAACATCTTCACCTGGAGACCTTCAAAGCTGTGCTTGATGGACTTG
ATGTGCTCCTTGCCCAGGAGGTTCGCCCCAGGAGGTGGAAACTTCAAGTGCTGGATT
TACGGAAGAACTCTCATCAGGACTTCTGGACTGTATGGTCTGGAAACAGGGCCAGT
CTGTACTCATTTCCAGAGCCAGAAGCAGCTCAGCCCATGACAAAGAAGCGAAAAGT
AGATGGTTTGAGCACAGAGGCAGAGCAGCCCTTCATTCCAGTAGAGGTGCTCGTAG
ACCTGTTCCTCAAGGAAGGTGCCTGTGATGAATTGTTCTCCTACCTCATTGAGAAAG
TGAAGCGAAAGAAAAATGTACTACGCCTGTGCTGTAAGAAGCTGAAGATTTTTGCA
ATGCCCATGCAGGATATCAAGATGATCCTGAAAATGGTGCAGCTGGACTCTATTGA
AGATTTGGAAGTGACTTGTACCTGGAAGCTACCCACCTTGGCGAAATTTTCTCCTTA
CCTGGGCCAGATGATTAATCTGCGTAGACTCCTCCTCTCCCACATCCATGCATCTTCC
TACATTTCCCCGGAGAAGGAAGAGCAGTATATCGCCCAGTTCACCTCTCAGTTCCTC
AGTCTGCAGTGCCTGCAGGCTCTCTATGTGGACTCTTTATTTTTCCTTAGAGGCCGCC
TGGATCAGTTGCTCAGGCACGTGATGAACCCCTTGGAAACCCTCTCAATAACTAACT
GCCGGCTTTCGGAAGGGGATGTGATGCATCTGTCCCAGAGTCCCAGCGTCAGTCAGC
TAAGTGTCCTGAGTCTAAGTGGGGTCATGCTGACCGATGTAAGTCCCGAGCCCCTCC
AAGCTCTGCTGGAGAGAGCCTCTGCCACCCTCCAGGACCTGGTCTTTGATGAGTGTG
GGATCACGGATGATCAGCTCCTTGCCCTCCTGCCTTCCCTGAGCCACTGCTCCCAGC
TTACGACCTTAAGCTTCTACGGGAATTCCATCTCCATATCTGCCCTGCAGAGTCTCCT
GCAGCACCTCATCGGGCTGAGCAATCTGACCCACGTGCTGTATCCTGTCCCCCTGGA
GAGTTATGAGGACATCCATGGTACCCTCCACCTGGAGAGGCTTGCCTATCTGCATGC
CAGGCTCAGGGAGTTGCTGTGTGAGTTGGGGCGGCCCAGCATGGTCTGGCTTAGTGC
CAACCCCTGTCCTCACTGTGGGGACAGAACCTTCTATGACCCGGAGCCCATCCTGTG
CCCCTGTTTCATGCCTAATTAGCTGGGTGCACATATCAAATGCTTCATTCTGCATACT
TGGACACTAAAGCCAGGATGTGCATGCATCTTGAAGCAACAAAGCAGCCACAGTTT
CAGACAAATGTTCAGTGTGAGTGAGGAAAACATGTTCAGTGAGGAAAAAACATTCA
GACAAATGTTCAGTGAGGAAAAAAAGGGGAAGTTGGGGGTAGGCAGATGTTGACTT
GAGGAGTTAATGTGATCTTTGGGGAGATACATCTTATAGAGTTAGAAATAGAATCTG
AATTTCTAAAGGGAGATTCTGGCTTGGGAAGTACATGTAGGAGTTAATCCCTGTGTA
GACTGTTGTAAAGAAACTGTTGAAAATAAAGAGAAGCAATGTGAAGC

SEQ ID NO: 38 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антигены 7 и 8)
GAGACAGGTCTCACTCTGTTGCCCGGTCAGGAAAGTGGCACAATCACAGCTC

ACTGCAGTCTCAGTCTCCCAGGCTCAAGATGGATACATTTAAGGTATGGTGATCCGG
TCCACCGTGTGGTTAGGATTCCCAAATTTTGTTGACAGCGTCTCGGATATGAACCAC
ACGGAAATTTGGCCTGCTGCTTTCTGCGTGGGGAGTGCGATGTGGATCCAGCTGTTG
TACAGTGCCTGCTTCTGGTGGCTGTTTTGCTATGCAGTGGATGCTTATCTGGTGATCC
GGAGATCGGCAGGACTGAGCACCATCCTGCTGTATCACATCATGGCGTGGGGCCTG
GCCACCCTGCTCTGTGTGGAGGGAGCCGCCATGCTCTACTACCCTTCCGTGTCCAGG
TGTGAGCGGGGCCTGGACCACGCCATCCCCCACTATGTCACCATGTACCTGCCCCTG
CTGCTGGTTCTCGTGGCGAACCCCATCCTGTTCCAAAAGACAGTGACTGCAGTGGCC
TCTTTACTTAAAGGAAGACAAGGCATTTACACGGAGAACGAGAGGAGGATGGGAGC
CGTGATCAAGATCCGATTTTTCAAAATCATGCTGGTTTTAATTATTTGTTGGTTGTCG
AATATCATCAATGAAAGCCTTTTATTCTATCTTGAGATGCAAACAGATATCAATGGA
GGTTCTTTGAAACCTGTCAGAACTGCAGCCAAGACCACATGGTTTATTATGGGAATC
CTGAATCCAGCCCAGGGATTTCTCTTGTCTTTGGCCTTCTACGGCTGGACAGGATGC
AGCCTGGGTTTTCAGTCTCCCAGGAAGGAGATCCAGTGGGAATCACTGACCACCTCG
GCTGCTGAGGGGGCTCACCCATCCCCACTGATGCCCCATGAAAACCCTGCTTCCGGG
AAGGTGTCTCAAGTGGGTGGGCAGACTTCTGACGAAGCCCTGAGCATGCTGTCTGA
AGGTTCTGATGCCAGCACAATTGAAATTCACACTGCAAGTGAATCCTGCAACAAAA
ATGAGGGTGACCCTGCTCTCCCAACCCATGGAGACCTATGAAGGGGATGTGCTGGG
GGTCCAGACCCCATATTCCTCAGACTCAACAATTCTTGTTCTTTAGAACTGTGTTCTC
ACCTTCCCAACACTGCACTGCCGAAGTGTAGCGGCCCCCAAACCTTGCTCTCATCAC
CAGCTAGAGCTTCTTCCCGAAGGGCCTTTAGGATAGGAGAAAGGGTTCATGCACAC
ACGTGTGAGA

SEQ ID NO: 39 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антиген 9)

CCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAATCCG
GGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGGGGAGATTGTGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGAC
AGAGGGAGACTCCATATCAAAAAGAAAAAAAAATCTCTAGAGTTTGGAAACATTTA
CCAACCAAACCACTGATTTCTCATCACCTCTTAGTCAAACCTCCTTGGATGGCCTTCA
GAGGAGAACAGAGTAAACACCAGAAGAACTCAGGAGGAAGGAGACTGAAGGAAA
GATGTATAGCCTGCGAGAAAGAAAGGGTCATGCATACAAAGAGATCAGCGAGCCAC
AGGATGATGACTACCTCTATTGTGAGATGTGTCAGAACTTCTTCATTGACAGCTGTG
CTGCTCATGGGCCCCCTACATTTGTAAAGGACAGTGCAGTGGACAAGGGGCATCCC
AACCGTTCAGCCCTCAGTCTGCCCCCGGGGCTGAGAATTGGGCCATCAGGCATCCCT
CAGGCTGGGCTTGGAGTATGGAACGAGGCATCTGATCTGCCACTGGGTCTGCACTTT
GGCCCCTATGAGGGCCGAATTACAGAAGACGAAGAGGCAGCCAACAGTGGATATTC
CTGGCTAATCACCAAGGGGAGAAACTGCTATGAGTATGTGGATGGAAAAGATAAAT
CCTCGGCCAACTGGATGAGAACCAAAGCCAGAGATCCATCCATGTCCCTCATGCTGT
CTGGCCTTTTCAAGTCAAAAATTTCTCAGTCAACATGTGGAACGCAATCACTCCTCT
CAGAACTTCCCAGGACCATCTGCAAGAAAACTTCTCCAACCAGAGAATCCCTGCCC
AGGGGATCAGAATCAGGAGCGGCAATATTCTGATCCACGCTGCTGTAATGACAAAA
CCAAAGGTCAAGAGATCAAAGAAAGGTCCAAACTCTTGAATAAAAGGACATGGCA

GAGGGAGATTTCAAGGGCCTTTTCTAGCCCACCCAAAGGACAAATGGGGAGCTCTA
GAGTGGGAGAAAGAATGATGGAAGAAGAGTCCAGAACAGGCCAGAAAGTGAATCC
AGGGAACACAGGCAAATTATTTGTGGGGGTAGGAATCTCAAGAATTGCGAAAGTCA
AATATGGAGAGTGTGGGCAAGGTTTCAGTGATAAGTCAGATGTTATTACACACCAA
AGGACACACACAGGGGGGAAGCCCTACGTCTGCAGAGAGTGTGGGAGGGCTTTAGC
CGGAAGTCAGACCTCCTCAGTCACCAGAGGACACACACAGGGGAGAAGCCTTATGT
CTGCAGAGAGTGTGAGCGGGGCTTTAGCCGGAAGTCAGTCCTCCTCATTCACCAGA
GGACACACAGGGGAGACGCCCCAGTCTGCAGGAAGGATGAGTAAGTCATTAGTAAT
AAAACCTTATCTCAATAGCCACAAGAAGACAAACGTGATCACCACACACTTGCACA
CCCCAGCTCTGAGGTGGCTTCAGCGAAAGTCTGCTAACCCCTTACATTCCCCGAGAG
TGTAAAGAGATCGGAAATAACTAATTAAACAAATCCGCCACTTTCATGACTAGAGTT
GAGGAAGAACAGGGGATAGTTCTGTAAGTGTTCGGGGGACGTCAACATGTGTGGTT
GTTTCCCGCACTGATCCCCTCCATTTTTTGTGTTTTGCCTCCTGTTCTAATTAATTTTG
TCTCCATACATATCTGAACCCCAAGTGTGTACCTCATTCTTCCCTTATCACTGAAGGA
AGGAAGAGTCCAGAAGGGCCACAGAGAACTCAAACGTTCAGTTCAAGTCTCCACAG
GAATTCAACCCCAGAAAGACATAAACTTGGAGTCCATCTGGTTTAATTATTGGAGAA
TCGATTCCCAAGTCCAGGAAGAGAAATGTAGGGTTTTACAGAGTCGCAGCAGGAAA
GAGAGCTCCCTGGTCTCCTGGGAAGTGTGACCTCTTCTAATGGACCCCTCTCCTCTG
CTGCCATACTCCCCCTTGGCTCCCCCTGTCTCCTCTCCTGATTTCCTCCAATCTCTGTA
GCCCCAGAAGTGAACGCCAGACAGGAACACGCATGTGTGTATATATGTGTTCACGT
GTGCTATGTGTGTTAAGCCTGCATGCATGGGTGTGGGGGTATGTGCCCTCTGTGTAC
GTATCTGTGTGAGTGTGGGGGTTTCAAGGGTGTATTAGGAATAACGCTCAAAATCCT
AAGGAAATTGAATACTCTGAGAGAAGAGAGACAGACCCTCTCATACTGTTTTATATT
GTTTTATACTCAGAAAAGGAAAAAGAAGCAAAACTAAAGGCAGGTAGCCTGGCGCC
TAGGAACCAGACCTGAAACCAAGGAACCAGACCCGAAACCAGGCCTGGGCCGGCCT
GACCTAAGCCTGGTAGTTAAAATTCGACCCCTGACCTAGCAACTGATGTTATCTATA
GATTATAGAAAGACATTGTGAAACTTCCCGGTCTGTTCTGTTCCACTCTGACCATCG
GTGCATGCAGCCCCTGTCACCTACCCCCTGCTTGCTCAATCGATCACGACCCTCTCA
CGTGGACCCCCTTAGAGTTGTGAGCCCTTAAAAGGGACAGGAATTGCTCACTCGGG
GAGCTCGGCTCTTGAGACAGCAGTCTTGCTGATGCTCCTGGCCGAATAAACCGCTTC
CTTCTTT

SEQ ID NO: 40 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антиген 10)

CCCACCTACTGATTTACCAACTCTTTTTCATTTCAACTTTTATTTTAGGTCCAG
AGGGTACATGTGTGAGTTTGTTGCATGAGTATATTGTGTGACACTCATGTATGGGGT
ACAAATAATCCCAACACCAATGTAGAGAACACAATATCCAATAGGCAGTTCTTCAG
GCCCTTTCTCCATCCTGCCCTCCCCCACATGGTAGATCCCAGTGTCTATTGTGCCCAT
CTTTATGTCCATGCATAACCAATGTTTAGTTCCCACTTATAAGTGAGAGCATGCAGT
ATTGGGCTTTCTGTGCCCACATTAATTCACTTAAGATAATGGTCTCCAGCTGGATCC
ATATTGATGCAAAGTACATAATTTCTTTCATTTTATGGCTGCATAGTATTCCATGTTA
TGTTTGTACCACATTTTCTTTATCCAGTCCATAGCTGATGGACATCTACATTGATTCC

ATGTCCTCATTAATGTGAATAGTGTTTTGATGAACATATGAATGTATGTGTCTTTTTG
GTAGAATAATTTATTTTCCTTTGGATATAAAGCCAGTAATGGAATTGCTGGGTCGAA
TCGTCGTTCTTTTGTAAGTTCTTTGAGATATCTCCAAGTTTCGTTCCACAGGCACTGA
AATAGTTTACATTCCCACCAATAATGAACACGCATTCCCTTTTCTCCACAACCCTGTC
AACATCTGTTATTTTTTTACTTTTTAATAGTAGCCATTCTGACTGGTGTGTGATGGTA
CTTCATTATGGCTTTCATTCGCATTTCTTTCCTGACTTGTGATTTTGAGTAGTTTTTCA
TATGTTTGTTGGCGACATGTATGTCTTCTGAGAAGAGCCTGTTCATGTTTTTTGCCCA
CTTCTTAACAGGGCTGTTCATCTTTTGCTTGTTGATTTGTTCAAGTTTCTTAGAGATA
GTGGATATTAGATCTCTGTTGGATGCATAGTTTGCAAATATTTTCTCTCTGTCTGTTT
ACCCTGTTGATAGTTTCTTTTATTGTGCAGAAACCCTTTAATTTAATCAGGTCCAACT
TATCCATTTTTCTTTTGGTTGAAATTGCTTTTGAGGACTTAGTTATGAATTATTTGCC
AAAGCTGACGTCAAGAAGGGTATTCTCTAGGTTTTCTTATATGACATTTTATAGTTTT
AGGTCTTATATTAAAGTCTTTGTTTCATCTCAAATTGACTTTTTTTCTCTGGTAAAAG
GTAGGGGTCCAGTTCAAGCTCATTTTTCCATGTGGTTTTGTTACAGTGGGTAGCTGC
AGACATGAGCTGGGCAGGAGAGGCCTCTTCCTAACAGGAATGTCAGGTGACCA

SEQ ID NO: 41 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 1)

ATGTGGAACTTCTTCAGGAGAGAATTAACATCCAATGGATTCCCAGAAAACT
TTTCCCTCGATGTACCAGCAAACACCTACAATGCCCTGAAAAGCCGCCTCTGCGACC
CCAATGCAGATCACACGTCCTGTCCCAGCCCCTGCAGCCTCCACGCGGCGGGTGCAC
TGCCAGGCACGGGAAGGCAGCGCTGGCGAGTAGAACTGGCCCATCTCGCAGATAGG
AAGCTGAGCCTCAGGGACGTTTCACGCCTTCGTCAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGG
GATTGCCGTGAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGGTTTGCTGCCCGACTTCAGGGAT
CTGTCACCCTCGTCCAGCAGGGTTGGTTCTTCCCGAGGCTGGGAGGATGCCAAGCCT
GGTGGAGGATGGGGGCGGTGGTGTGGTGTGGGGAGCTTCTGACTTGCACATCC

SEQ ID NO: 42 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 2)

ATGACTGGTGTTCTTATAAGAAGAGGAGATTTGGTCACAGACATGGTTGCAT
GCAGAATAAAGACTTTTCGAGGACACACTGAGAAGGCAGCCATCTGCAAAACAAGG
AAAGAGTCCTCAGCAGAAACCAGTCCTGCAGACTCCTTGATCTTGGACTTCCAGCCA
CTGCAATTGATGTCAAGCTTCAGCACCCTTGCATCTCTGGATAAA

SEQ ID NO: 43 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 3)

ATGAATACTCCTAACATTGTCTCTTTAAGAGCTCACCAGCCTGAGGTAGGAAT
CATTCCATCTGTGTTACTAATGAGACCGCTGAGGATCAAAGGGGTTTTCCACCACAT
CCACTCACCTCTACATGGCGAAAACCAAGGGTTCACTCTCTGTCTTCAGGGAGCTCC
ACCCAGCAGCAGCGTT

SEQ ID NO: 44 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 4)

ATGGCGAAAACCAAGGGTTCACTCTCTGTCTTCAGGGAGCTCCACCCAGCAG
CAGCGTTTGACAGAGCTGTTCACTTCCTCTTCCTGGAGCTGTGGCTTCCAGAGCCCA
TGCTCAGCAGTTCCCCTCCTTCTTCGACTGCTCCTCTCTTAGGCTCAGAGCCACTCAG
ACATTGGGAAGCAAGTTTGTCAAGA

SEQ ID NO: 45 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 5)

ATGAAGAGGAAAGCAAACAGGTGGAGACTCAGCCTGAGAAATGGTCTGTTG
CCAAGCACACCCAGAGCTACCCAACAGATTCCTATGGAGTTCTTGAATTCCAGGGTG
GCGGATATTCCAATAAAGCCATGG

SEQ ID NO: 46 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 6)

ATGCGTGGATTTCTGTGGAGAGTGGAAACACGGGGAGTCGAGGGGAGCATG
CGCGGGCCTCAGAAAGTTCTGGGAAACCGACTCCCGGGAGCAGGGAGGAACGCGC
GCTCCAGAGACAACTTCGCGGTGTGG

SEQ ID NO: 47 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 7)

ATGGTTTATTATGGGAATCCTGAATCCAGCCCAGGGATTTCTCTTGTCTTTGG
CCTTCTACGGCTGGACAGGATGCAGCCTGGGTTTTCAGTCTCCCAGGAAGGAGATCC
AGTGGGAATCACTGACCACCTCGGCTGC

SEQ ID NO: 48 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 8)

ATGCCAGCACAATTGAAATTCACACTGCAAGTGAATCCTGCAACAAAAATGA
GGGTGACCCTGCTCTCCCAACCCATGGAGACCTATGAAGGGGATGTGCTGGGGGTC
CAGACCCCATATTCCTCAGACTCAACAATTCTTGTTCTT

SEQ ID NO: 49 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 9)

ATGGGGAGCTCTAGAGTGGGAGAAAGAATGATGGAAGAAGAGTCCAGAACA
GGCCAGAAAGTGAATCCAGGGAACACAGGCAAATTATTTGTGGGGGTAGGAATCTC
AAGAATTGCGAAAGTCAAATATGGAGAGTGTGGGCAAGGTTTCAGTGATAAGTCAG
ATGTTATTACACACCAAAGGACACACACAGGGGGGAAGCCCTACGTCTGCAGAGAG
TGTGGGAGGGCTTTAGCCGGAAGTCAGACCTCCTCAGTCACCAGAGGACACACACA
GGGGAGAAGCCTTATGTCTGCAGAGAGTGTGAGCGGGGCTTTAGCCGGAAGTCAGT
CCTCCTCATTCACCAGAGGACACACAGGGGAGACGCCCCAGTCTGCAGGAAGGATG
AGTAAGTCATTAGTAATAAAACCTTATCTCAATAGCCACAAGAAGACAAACGTGAT
CACCACACACTTGCACACCCCAGCTCTGAGGTGGCTTCAGCGAAAGTCTGCTAACCC
CTTACATTCCCCGAGAGTG

SEQ ID NO: 50 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 10)

ATGCATAGTTTGCAAATATTTTCTCTCTGTCTGTTTACCCTGTTGATAGTTTCT
TTTATTGTGCAGAAACCCTTTAATTTAATCAGGTCCAACTTATCCATTTTTCTTTTGG
TTGAAATTGCTTTTGAGGACTTAGTTATGAATTATTTGCCAAAGCTGACGTCAAGAA
GGGTATTCTCTAGGTTTTCTTATATGACATTTTATAGTTTTAGGTCTTATATTAAAGT
CTTTGTTTCATCTCAAATTGACTTTTTTTCTCTGGTAAAAGGTAGGGGTCCAGTTCAA
GCTCATTTTTCCATGTGGTTTTGTTACAGTGGG

SEQ ID NO: 51 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)

AAFDRAVHF

SEQ ID NO: 52 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)

AFDRAVHF

SEQ ID NO: 53 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 3)

RPLRIKGVF

SEQ ID NO: 54 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)

KTKGSLSVF
SEQ ID NO: 55 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)
VPANTYNALK
SEQ ID NO: 56 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)
RLGGCQAWWR
SEQ ID NO: 57 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)
ANTYNALKSR
SEQ ID NO: 58 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
LVTDMVACRI
SEQ ID NO: 59 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
LILDFQPLQL
SEQ ID NO: 60 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
MSSFSTLASL
SEQ ID NO: 61 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
LMSSFSTLASL
SEQ ID NO: 62 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
LMSSFSTLA
SEQ ID NO: 63 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
QLMSSFSTLA
SEQ ID NO: 64 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
MVACRIKTFR
SEQ ID NO: 65 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
VTDMVACRIK
SEQ ID NO: 66 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
SPADSLIL
SEQ ID NO: 67 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 3)
NTPNIVSLRA
SEQ ID NO: 68 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 3)
VLLMRPLRIK
SEQ ID NO: 69 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 3)
MRPLRIKGVF
SEQ ID NO: 70 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)
FLFLELWL
SEQ ID NO: 71 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)
SVFRELHPA
SEQ ID NO: 72 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)
SPPSSTAPL
SEQ ID NO: 73 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)
RLQGSVTLV
SEQ ID NO: 74 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)

VPANTYNAL

SEQ ID NO: 75 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
QLMSSFSTL

SEQ ID NO: 76 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)
FLELWLPEPML

SEQ ID NO: 77 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 4)
APLLGSEPL

SEQ ID NO: 78 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 2)
SLILDFQPL

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептид, содержащий последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1-10; и

варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

2. Выделенный пептид по п. 1, содержащий или состоящий из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-32 и 51-78.

3. Выделенный полипептид по пп. 1 или 2, слитый со вторым или дополнительным полипептидом, выбранным из (i) одного или более других полипептидов по пп. 1 или 2, (ii) других полипептидов, которые представляют собой ассоциированные с меланомой антигены, (iii) полипептидных последовательностей, которые способны усиливать иммунный ответ (т.е. иммуностимулирующие последовательности) и (iv) полипептидных последовательностей, например, содержащих универсальные эпитопы CD4 хелперов, которые способны обеспечивать сильную CD4+ помощь в усилении CD8+ Т-клеточных ответов на эпитопы антигена.

4. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-3.

5. Нуклеиновая кислота по п. 4, которая представляет собой ДНК.

6. Нуклеиновая кислота по п. 5, содержащая или состоящая из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33-40 и 41-50.

7. Нуклеиновая кислота по п. 6, которая является кодон-оптимизированной в отношении экспрессии в человеческой клетке-хозяине.

8. Нуклеиновая кислота по п. 4, которая представляет собой РНК.

9. Нуклеиновая кислота по пп. 4, 5, 7 или 8, которая представляет собой искусственную последовательность нуклеиновой кислоты.

10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 4-9.

11. Вектор по п. 10, который содержит ДНК, кодирующую регуляторные элементы, подходящие для обеспечения транскрипции трансляционно активной молекулы РНК в человеческой клетке-хозяине.

12. Вектор по пп. 10 или 11, который представляет собой вирусный вектор.

13. Вектор по п. 12, который представляет собой аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAB), альфавируса, вируса герпеса, аренавируса, вируса кори, поксвируса, парамиксовируса, лентивируса и рабдовируса.

14. Иммуногенная фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1-13 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

15. Композиция вакцины, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1-13 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

16. Композиция по пп. 14 или 15, которая содержит один или более иммуностимуляторов.

17. Композиция по п. 16, в которой иммуностимуляторы выбраны из солей алюминия, сапонинов, иммуностимулирующих олигонуклеотидов, эмульсий типа «масло в воде», аминоалкилглюкозаминид-4-фосфатов, липополисахаридов и их производных, и других лигандов TLR4, лигандов TLR7, лигандов TLR8, лигандов TLR9, ИЛ-12 и интерферонов.

18. Композиция по любому из пп. 14-17, которая представляет собой стерильную композицию, подходящую для парентерального введения.

19. Полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1-18 для применения в медицине.

20. Способ формирования иммунного ответа у человека, который включает введение указанному человеку полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1-18.

21. Способ по п. 20, в котором формируется иммунный ответ против злокачественной опухоли, экспрессирующей последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и вариантов, и иммуногенных фрагментов любой из них.

22. Полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1-18 для применения в формировании иммунного ответа у человека.

23. Полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по п. 22, в которых формируется иммунный ответ против злокачественной опухоли, экспрессирующей соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов или вариантов любой из них.

24. Способ лечения пациента-человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или предотвращения развития злокачественного новообразования у человека, при котором может экспрессироваться последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, при этом способ включает введение указанному человеку соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1-18.

25. Полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1-18 для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них.

26. Полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1-18 для применения в стимуляции ex vivo и/или амплификации Т-клеток, полученных от человека, страдающего от злокачественного новообразования, для последующего повторного введения указанных стимулированных и/или амплифицированных Т-клеток указанному человеку для лечения указанного злокачественного новообразования у указанного человека.

27. Способ лечения злокачественного новообразования у человека, причем раковые

клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, который включает забор у указанного человека популяции лейкоцитов, содержащей по меньшей мере Т-клетки, необязательно с антигенпрезентирующими клетками, стимуляцию и/или амплификацию указанных Т-клеток в присутствии соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1-18, и повторное введение человеку некоторых или всех из указанных лейкоцитов, по меньшей мере стимулированных и/или амплифицированных Т-клеток.

28. Способ или полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция для применения по любому из пп. 21 и 23-27, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи.

29. Способ получения популяции Т-клеток, цитотоксических в отношении раковых клеток, экспрессирующих последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов, и вариантов любой из них, который включает (a) получение Т-клеток, необязательно, с антигенпрезентирующими клетками от пациента со злокачественным новообразованием и (ii) стимуляцию и амплификацию популяции Т-клеток ex vivo с помощью соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1-18.

30. Популяция Т-клеток, полученная при помощи способа по п. 29.

31. Т-клетка, стимулированная полипептидом, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по любому из пп. 1-18.

32. Антигенпрезентирующая клетка, модифицированная при помощи загрузки ex vivo полипептидом, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по любому из пп. 1-18, или генетически сконструированная для экспрессии полипептида по любому из пп. 1-3.

33. Антигенпрезентирующая клетка по п. 32, которая представляет собой дендритную клетку.

34. Экзосома, нагруженная полипептидом, полученная из клеток, нагруженных полипептидом, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по любому из пп. 1-18, или генетически сконструированная для экспрессии полипептида по любому из пп. 1-3.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию Т-клеток, Т-клетку, антигенпрезентирующую клетку или экзосому по любому из пп. 30-34 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

36. Популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка или экзосома по любому из пп. 30-34 для применения в медицине.

37. Способ лечения человека, страдающего раком, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или предотвращения развития злокачественного новообразования у человека, при этом раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и

вариантов любой из них, который включает введение указанному человеку популяции Т-клеток, Т-клетки, антигенпрезентирующей клетки, экзосомы или композиции по любому из пп. 30-35.

38. Популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция по любому из пп. 30-35 для применения в лечении или профилактике злокачественного образования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них.

39. Способ или популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция для применения по любому из пп. 29, 37 и 38, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи.

40. Выделенный антигенсвязывающий полипептид, который является иммуноспецифическим в отношении полипептида по любому из пп. 1-3.

41. Антигенсвязывающий полипептид по п. 40, который представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

42. Антигенсвязывающий полипептид по пп. 40 или 41, который связан с цитотоксическим фрагментом.

43. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 40-42 для применения в медицине.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 40-42 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

45. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или предотвращения злокачественного новообразования у человека, при этом раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, который включает введение указанному человеку антигенсвязывающего полипептида или композиции по любому из пп. 40-42 и 44.

46. Антигенсвязывающий полипептид или композиция по любому из пп. 40-42 и 44 для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любого из них.

47. Способ, антигенсвязывающий полипептид или композиция по пп. 45 или 46, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи.

48. Выделенный антигенсвязывающий полипептид, который является иммуноспецифическим в отношении HLA-связанного полипептида, который представляет собой полипептид по любому из пп. 1-3 или является его частью.

49. Антигенсвязывающий полипептид по п. 48, который представляет собой Т-

клеточный рецептор или его фрагмент.

50. Антигенсвязывающий полипептид по пп. 48 или 49, который связан с другим полипептидом, который способен связываться с цитотоксическими клетками или другими иммунными компонентами у субъекта.

51. Цитотоксическая клетка, которая была сконструирована для экспрессии антигенсвязывающего полипептида по любому из пп. 48-50 на своей поверхности.

52. Цитотоксическая клетка по п. 51, которая представляет собой Т-клетку.

53. Цитотоксическая клетка по пп. 51 или 52 для применения в медицине.

54. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по пп. 51 или 52.

55. Способ лечения пациента-человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, или предотвращения злокачественного новообразования у человека, при котором может экспрессироваться последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 1-10, и иммуногенных фрагментов и вариантов любой из них, при этом способ включает введение указанному человеку клетки по пп. 51 или 52.

56. Цитотоксическая клетка по пп. 51 или 52 для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов любой из них.

57. Способ диагностирования у человека злокачественного новообразования, включающий следующие стадии:

определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов или вариантов любой из них, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную полипептидную последовательность, и диагностирование у указанного человека злокачественного новообразования, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируются в указанных раковых клетках.

58. Способ диагностирования у человека злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи, включающий стадии: определения того, экспрессируют ли клетки указанного рака полипептидную последовательность любой из SEQ ID NO: 2, 6, 7, 8 и 9 и их иммуногенных фрагментов или вариантов; или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную полипептидную последовательность, и диагностирования у указанного человека злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируются в указанных раковых клетках.

59. Способ диагностирования у человека злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, включающий следующие стадии: определение того, экспрессируют ли клетки указанного

злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, и 10, и иммуногенных фрагментов или вариантов любой из них; или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную полипептидную последовательность, и диагностирования у указанного человека злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируются в указанных раковых клетках.

60. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, включающий следующие стадии:

(a) определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10 и иммуногенных фрагментов или вариантов любой из них, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный полипептид (например, выбранный из последовательностей SEQ ID NO: 33-40 и 41-50); и если это так

(b) введение указанному человеку соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора, композиции, популяции Т-клеток, Т-клетки, антигенпрезентирующей клетки, экзосомы, антигенсвязывающего полипептида или цитотоксической клетки по любому из пп. 1-18, 30-35, 40-42, 44, 50, 51 и 53.

61. Применение полипептида, содержащего последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1-10; или

варианта последовательностей из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (a), выделенной из опухоли человека, страдающего от злокачественного новообразования, или применение нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, в качестве биомаркера для определения того, подходит ли указанный человек для лечения вакциной, содержащей соответствующий полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор, композицию, популяцию Т-клеток, Т-клетку, антигенпрезентирующую клетку, экзосому, антигенсвязывающий полипептид или цитотоксическую клетку по любому из пп. 1-18, 30-35, 40-42, 44, 51, 52 и 54.

62. Способ или применение по пп. 60 или 61, в котором злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи

63. Способ или полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция для применения по любому из пп. 21 и 23-27, в которых полипептид содержит последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10; и

варианта последовательностей из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 и 76-77 и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой

из SEQ ID NO: 33, 35, 36 или 40, или выбранной из любой из 41, 43, 44, 45 и 50;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

64. Способ по п. 45 или антигенсвязывающий полипептид, или композиция для применения по п. 46, в котором полипептид содержит последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10; и

варианта последовательностей из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 и 76-77 и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33, 35, 36 или 40, или выбранной из любой из 41, 43, 44, 45 и 50;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

65. Способ или популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция для применения по любому из пп. 29, 37 и 38, в которых полипептид содержит последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10; и

варианта последовательностей из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 и 76-77 и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33, 34, 36 или 40, или выбранной из любой из 41, 43, 44, 45 и 50;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

66. Способ или применение по пп. 60 или 61, в котором полипептид содержит последовательность, выбранную из:

последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 и 10; и

(b) варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательностей из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 11-14, 17-18, 19, 20-22, 30-32, 51-57, 67-74 и 76-77, и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33, 35, 36 или 40, или выбранной из любой из 41, 43, 44, 45 и 50; и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

67. Слитый полипептид по п. 3, который содержит две или более (например, две, три или четыре) последовательности, выбранные из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4; или, в отношении каждой из указанных последовательностей, варианта последовательности или иммуногенного фрагмента последовательности.

68. Слитый полипептид по п. 67, который содержит:

(i) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 1; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a); и

(ii) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 2; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a); и

(iii) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 3; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a); и

(iv) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 4; и

варианта последовательности из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a).

69. Слитый полипептид по п. 68, который содержит последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4.

70. Слитый полипептид по п. 68, который содержит:

(i) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 1; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a); и

(ii) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 2; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a); и

(iii) последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO: 4; и

варианта последовательности из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a).

71. Слитый полипептид по п. 70, который содержит последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 4.

72. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый полипептид по любому из пп. 67-71.

73. Нуклеиновая кислота по п. 72, которая представляет собой ДНК.

74. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 73.

75. Вектор по п. 73, который содержит ДНК, кодирующую регуляторные элементы, подходящие для обеспечения транскрипции трансляционно активной молекулы РНК в

человеческой клетке-хозяине.

76. Вектор по пп. 74 или 75, который представляет собой вирусный вектор.

По доверенности

**Формула изобретения**

1. Выделенный полипептид, содержащий последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 1; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

2. Выделенный пептид по п. 1, содержащий или состоящий из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1, 11-14, 55-57 и 73-74.

3. Слитый полипептид, содержащий выделенный полипептид по п. 1 или п. 2, слитый со вторым или дополнительным полипептидом, выбранным из (i) одного или более других полипептидов, выбранных из (x) полипептидов, имеющих последовательности SEQ ID NO: 2-10, и иммуногенных вариантов полипептидов (x), которые по меньшей мере на 80% идентичны им, и иммуногенных фрагментов полипептидов (x), которые содержат по меньшей мере 9 смежных аминокислот последовательности указанного полипептида и (y) полипептидов, имеющих последовательности SEQ ID NO: 15-32, 51-54, 58-72 и 75-78 (ii) других полипептидов, которые представляют собой ассоциированные с меланомой антигены, (iii) полипептидных последовательностей, которые способны усиливать иммунный ответ (т.е. иммуностимулирующих последовательностей), и (iv) полипептидных последовательностей, например, содержащих универсальные эпитопы CD4 хелперов, которые способны обеспечивать сильную CD4 + помощь в усилении CD8+ Т-клеточных ответов на эпитопы антигена.

4. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый полипептид по п. 3.

5. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид по любому из пп. 1-3, или содержащий нуклеиновую кислоту по п. 4.

6. Нуклеиновая кислота по п. 4 или вектор по п. 5, в которых нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

7. Нуклеиновая кислота или вектор по п. 6, в которых нуклеиновая кислота содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 33 и 41.

8. Нуклеиновая кислота или вектор по п. 7, в которых нуклеиновая кислота является кодон-оптимизированной в отношении экспрессии в человеческой клетке-хозяине.

9. Нуклеиновая кислота по п. 4 или вектор по п. 5, в которых нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

10. Нуклеиновая кислота или вектор по любому из пп. 4, 5, 6, 8 и 9, в которых нуклеиновая кислота представляет собой искусственную последовательность нуклеиновой кислоты.

11. Вектор по любому из пп. 5–10, который содержит ДНК, кодирующую регуляторные элементы, подходящие для обеспечения транскрипции трансляционно активной молекулы РНК в человеческой клетке-хозяине.

12. Вектор по любому из пп. 5–11, который представляет собой вирусный вектор.

13. Вектор по п. 12, который представляет собой аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAB), альфавируса, вируса герпеса, аренавируса, вируса кори, поксвируса, парамиксовируса, лентивируса или рабдовируса.

14. Иммуногенная фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный полипептид, слитый белок, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1–13 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

15. Композиция по п. 14, которая содержит один или более иммуностимуляторов.

16. Композиция по п. 15, в которой иммуностимуляторы выбраны из солей алюминия, сапонинов, иммуностимулирующих олигонуклеотидов, эмульсий типа «масло в воде», аминоалкилглюкозаминид-4-фосфатов, липополисахаридов и их производных, и других лигандов TLR4, лигандов TLR7, лигандов TLR8, лигандов TLR9, ИЛ-12 и интерферонов.

17. Композиция по любому из пп. 14–16, которая представляет собой стерильную композицию, подходящую для парентерального введения.

18. Полипептид, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный полипептид, слитый полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–17 для применения в медицине.

19. Способ формирования иммунного ответа у человека, который включает введение указанному человеку полипептида, нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, вектора или композиции по любому из пп. 1–17.

20. Способ по п. 19, в котором формируется иммунный ответ против злокачественной опухоли, экспрессирующей последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80%

идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.
21. Полипептид, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный полипептид, слитый полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–17 для применения в формировании иммунного ответа у человека.
22. Полипептид, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный полипептид, слитый полипептид, вектор нуклеиновой кислоты или композиция по п. 21, в которых иммунный ответ формируется против раковой опухоли, экспрессирующей соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.
23. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, или предотвращения злокачественного новообразования у человека, при этом злокачественное новообразование будет экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, при этом способ включает введение указанному человеку соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, слитого полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–17.
24. Полипептид, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный полипептид, слитый полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–17 для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.
25. Полипептид, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный полипептид, слитый полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из

пп. 1–17 для применения в стимуляции *ex vivo* и/или амплификации Т-клеток, полученных от человека, страдающего от злокачественного новообразования, для последующего повторного введения указанных стимулированных и/или амплифицированных Т-клеток указанному человеку для лечения указанного злокачественного новообразования у указанного человека.

26. Способ лечения злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, который включает забор у указанного человека популяции лейкоцитов, содержащей по меньшей мере Т-клетки, необязательно с антигенпрезентирующими клетками, стимуляцию и/или амплификацию указанных Т-клеток в присутствии соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, слитого полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–17, и повторное введение человеку некоторых или всех из указанных лейкоцитов, по меньшей мере стимулированных и/или амплифицированных Т-клеток.

27. Способ или полипептид, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный полипептид, слитый полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция для применения по любому из пп. 20 и 22–26, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи.

28. Способ получения популяции Т-клеток, цитотоксичных для раковых клеток, экспрессирующих последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, который включает (a) получение Т-клеток, необязательно с антигенпрезентирующими клетками, от пациента со злокачественным новообразованием раком и (b) стимуляцию и амплификацию популяции Т-клеток *ex vivo* с помощью соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, слитого полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–17.

29. Популяция Т-клеток, получаемая при помощи способа, который включает (a) получение Т-клеток, необязательно с антигенпрезентирующими клетками, от пациента со злокачественным новообразованием и (b) стимуляцию и

амплификацию популяции Т-клеток *ex vivo* с помощью полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 1, или иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

30. Т-клетка, стимулированная полипептидом с последовательностью SEQ ID NO: 1, или иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

31. Антигенпрезентирующая клетка, модифицированная загрузкой *ex vivo* полипептидом, нуклеиновой кислотой, кодирующей указанный полипептид, слитым полипептидом, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по любому из пп. 1–17, или генетически сконструированная для экспрессии полипептида по любому из пп. 1–3.

32. Антигенпрезентирующая клетка по п. 31, которая представляет собой дендритную клетку.

33. Экзосома, нагруженная полипептидом, полученная из клеток, нагруженных полипептидом, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по любому из пп. 1–17, или генетически сконструированная для экспрессии полипептида по любому из пп. 1–3.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию Т-клеток, Т-клетку, антигенпрезентирующую клетку или экзосому по любому из пп. 29–33 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

35. Популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка или экзосома по любому из пп. 29–33 для применения в медицине.

36. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, или профилактики злокачественного человека у человека, причем раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, который включает введение указанному человеку популяции Т-клеток, Т-клетки, антигенпрезентирующей клетки, экзосомы или композиции по любому из пп. 29–34.

37. Популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция по любому из пп. 29–34 для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

38. Способ или популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция для применения по любому из пп. 28, 36 и 37, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи.

39. Выделенный антигенсвязывающий полипептид, который является иммуноспецифическим в отношении полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 1, или иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

40. Антигенсвязывающий полипептид по п. 39, который представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

41. Антигенсвязывающий полипептид по пп. 39 или 40, который связан с цитотоксическим фрагментом.

42. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 39–41 для применения в медицине.

43. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 39–41 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

44. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, или профилактики злокачественного человека у человека, причем раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, который включает введение указанному человеку антигенсвязывающего полипептида или композиции по любому из пп. 39–41 и 43.

45. Антигенсвязывающий полипептид или композиция по любому из пп. 39–41 и 43 для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

46. Способ, антигенсвязывающий полипептид или композиция по пп. 44 или 45, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи.

47. Выделенный антигенсвязывающий полипептид, который является иммуноспецифическим в отношении HLA-связанного полипептида, который представляет собой полипептид по любому из пп. 1–3 или является его частью.

48. Антигенсвязывающий полипептид по п. 47, который представляет собой Т-клеточный рецептор или его фрагмент.

49. Антигенсвязывающий полипептид по пп. 47 или 48, который связан с другим полипептидом, который способен связываться с цитотоксическими клетками или другими иммунными компонентами у субъекта.

50. Цитотоксическая клетка, которая была сконструирована для экспрессии антигенсвязывающего полипептида по любому из пп. 47–49 на своей поверхности.

51. Цитотоксическая клетка по п. 50, которая представляет собой Т-клетку.

52. Цитотоксическая клетка по пп. 50 или 51 для применения в медицине.

53. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по пп. 50 или 51.

54. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, или предотвращения злокачественного новообразования у человека, при этом злокачественное новообразование будет экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, который включает введение указанному человеку клетки по п. 50 или п. 51.

55. Цитотоксическая клетка по п. 50 или п. 51 для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

56. Способ диагностирования у человека злокачественного новообразования, включающий следующие стадии:

определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную полипептидную последовательность, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 33 и 41, и диагностирование у указанного человека злокачественного новообразования, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируются в указанных раковых клетках.

57. Способ диагностирования у злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или меланому глаза, включающий стадии: определения того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1; или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную полипептидную последовательность, и диагностирования у указанного человека злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или меланому глаза, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируется в указанных раковых клетках.

58. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, включающий следующие стадии:

(a) определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность,

выбранную из SEQ ID NO: 1, иммуногенного варианта SEQ ID NO: 1, по меньшей мере на 80% идентичного SEQ ID NO: 1, и иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 1, содержащего по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1 или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид (например, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 33 и 41); и если это так

(b) введение указанному человеку соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, слитого полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора, композиции, популяции Т-клеток, Т-клетки, антигенпрезентирующей клетки, экзосомы, антигенсвязывающего полипептида или цитотоксической клетки по любому из пп. 1–17, 29–34, 39–41, 43, 49, 50 и 52.

59. Применение полипептида, содержащего последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 1; или

(b) иммуногенного варианта последовательностей из (a), который по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 1; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1;

выделенной из опухоли человека, страдающего от злокачественного новообразования, или применение нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 33 и 41, в качестве биомаркера для определения того, подходит ли указанный человек для лечения вакциной, содержащей соответствующий полипептид, нуклеиновой кислотой, кодирующей указанный полипептид, слитым белком, нуклеиновой кислотой, вектором, композицией, популяцией Т-клеток, Т-клеткой, антигенпрезентирующей клетке, экзосомой, антигенсвязывающим полипептидом или цитотоксической клеткой по любому из пп. 1–17, 29–34, 39–41, 43, 50, 51 и 53.

60. Способ или применение по пп. 58 или 59, в котором злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи

61. Способ или полипептид, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный полипептид, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция для применения по любому из пп. 20 и 22-26, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому глаза.

62. Способ по п. 44 или антигенсвязывающий полипептид, или композиция для применения по п. 45, в котором злокачественное новообразование представляет собой меланому глаза.

63. Способ или популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция для применения по любому из пп. 28, 36 и 37, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому глаза.

64. Способ или применение по п. 58 или п. 59, в котором злокачественное новообразование представляет собой меланому глаза.

65. Слитый полипептид по п. 3, который содержит (x) полипептид, содержащий последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 1; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, и

(y) одной или более (например, одной, двух или трех) последовательностей, выбранных из последовательностей SEQ ID NO. 2, 3 и 4; или, в отношении каждой из указанных последовательностей SEQ ID NO: 2, 3 и 4, варианта указанной последовательности, который по меньшей мере на 80% идентичен указанной последовательности, или иммуногенного фрагмента, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот указанной последовательности.

66. Слитый полипептид по п. 65, который содержит:

(i) последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 1; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1; и

(ii) последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 2; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 2; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 2; и

(iii) последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 3; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 3; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 3; и

(iv) последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 4; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 4.

67. Слитый полипептид по п. 66, который содержит последовательности SEQ ID NO. 1, 2, 3 и 4.

68. Слитый полипептид по п. 66, который содержит:

(i) последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 1; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1; и

(ii) последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 2; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 2; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 2; и

(iii) последовательность, выбранную из:

(a) последовательности SEQ ID NO. 4; и

(b) иммуногенного варианта последовательности из (a), которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4; и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a), содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 4.

69. Слитый полипептид по п. 68, который содержит последовательности SEQ ID NO. 1, 2 и 4.

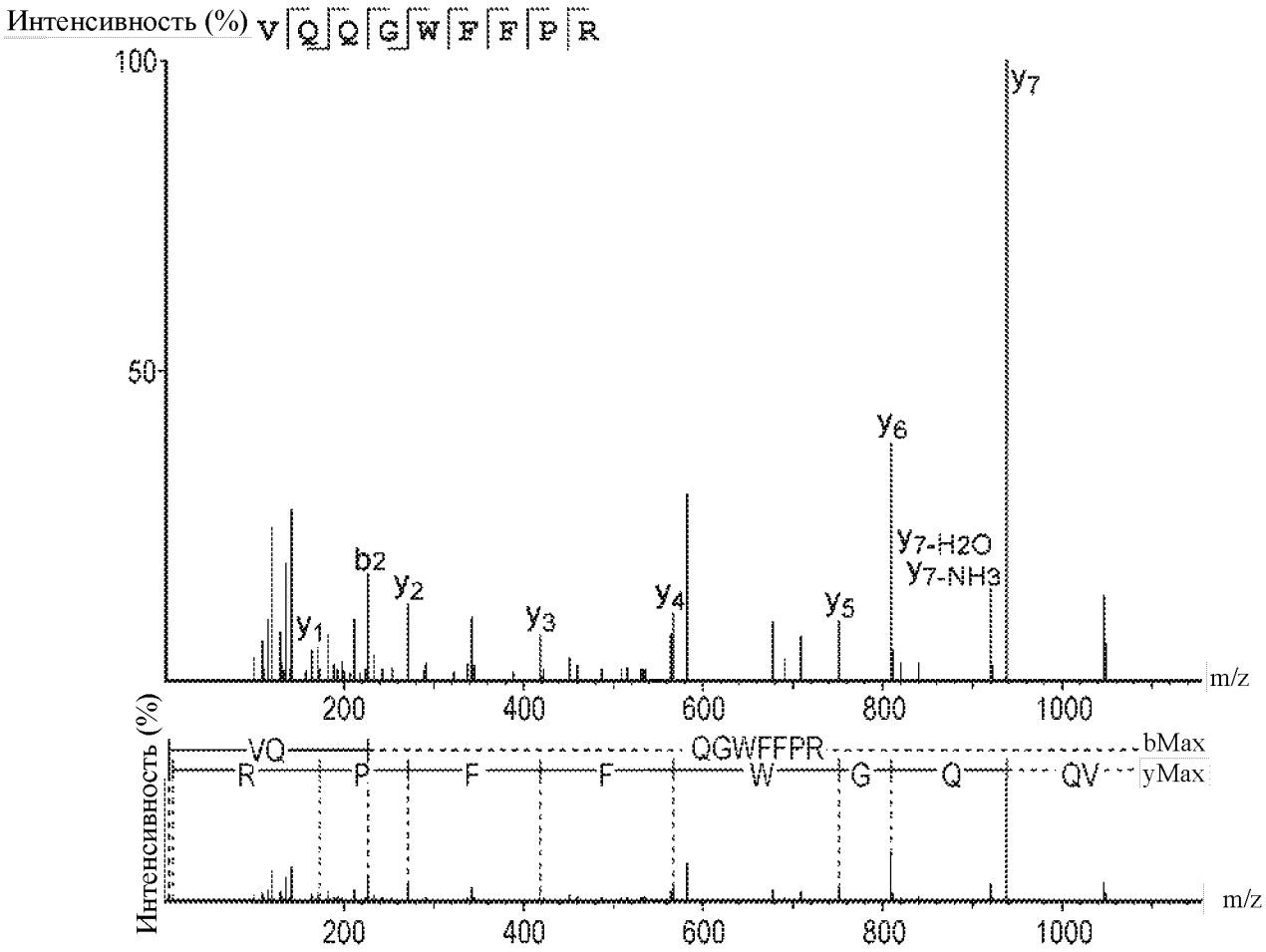
70. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый полипептид по любому из пп. 65–69.

71. Нуклеиновая кислота по п. 70, которая представляет собой ДНК.

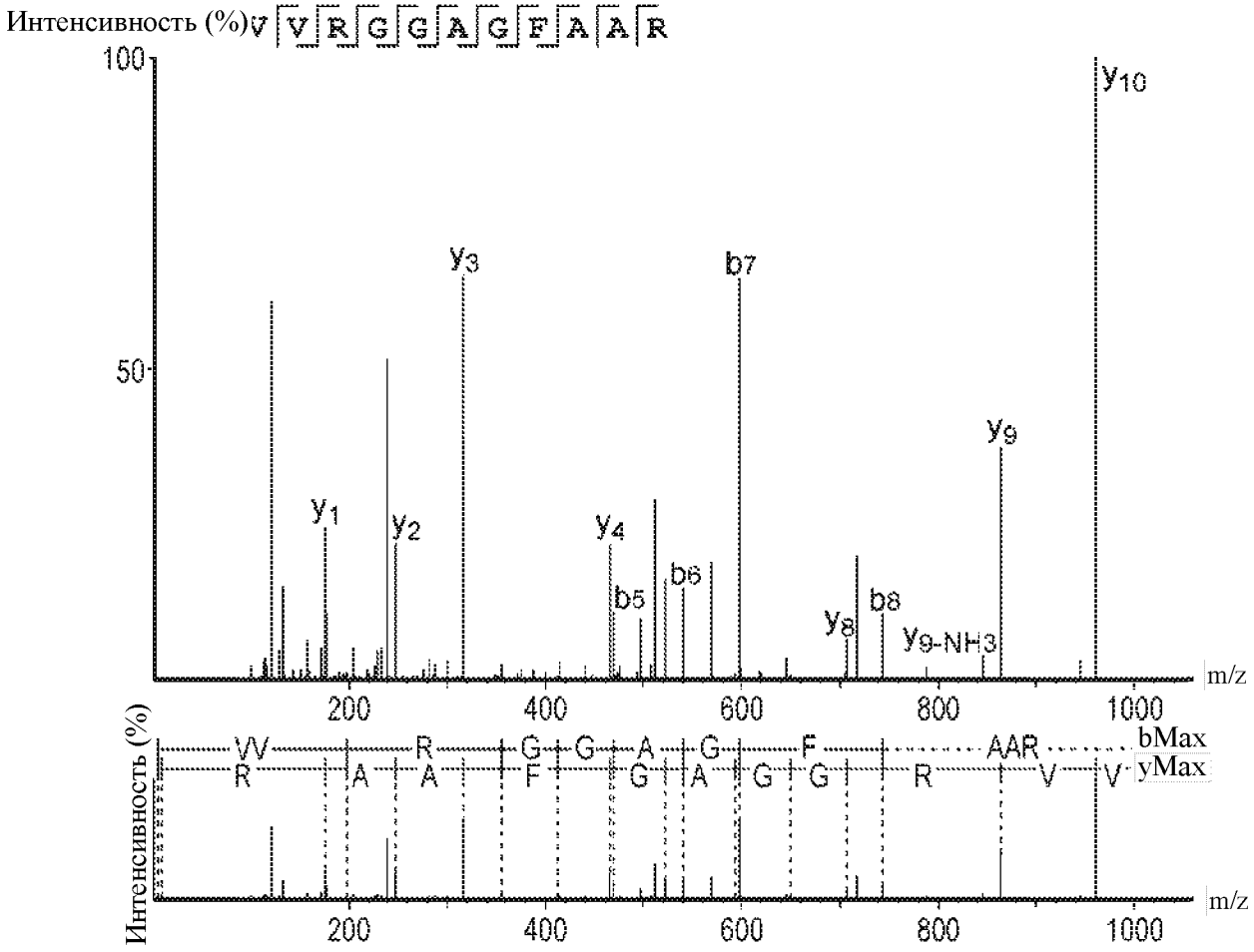
72. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 71.

73. Вектор по п. 71, который содержит ДНК, кодирующую регуляторные элементы, подходящие для обеспечения транскрипции трансляционно активной молекулы РНК в человеческой клетке-хозяине.

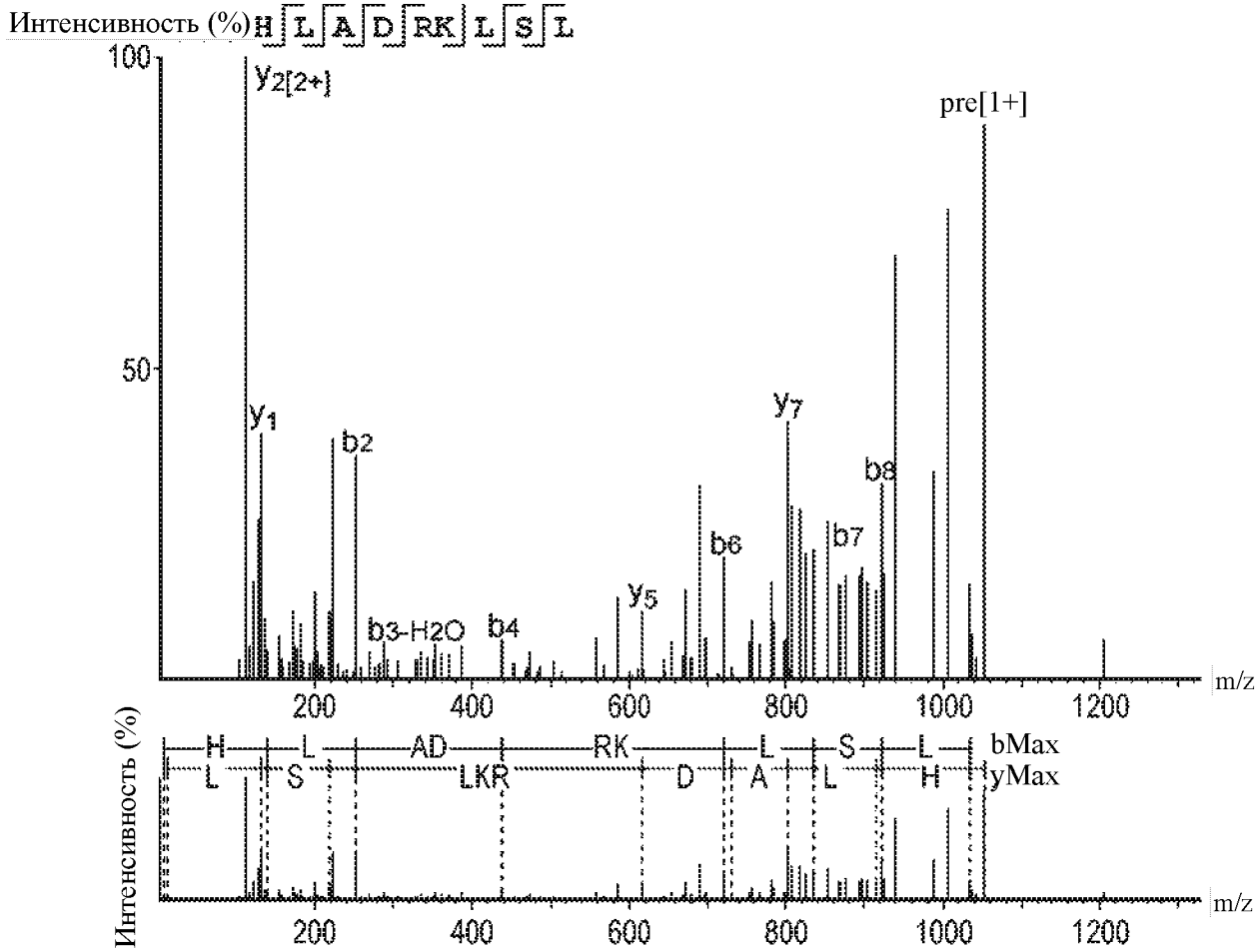
74. Вектор по пп. 72 или 73, который представляет собой вирусный вектор.


Интенсивность (%)
V Q Q G W F F P R
100
50
y7
y6
y7-H2O
y7-NH3
y5
y4
y3
y2
b2
y1
m/z
200
400
600
800
1000
Интенсивность (%)
VQ
QGWFFPR
bMax
R
P
F
F
W
G
Q
QV
yMax
m/z
200
400
600
800
1000

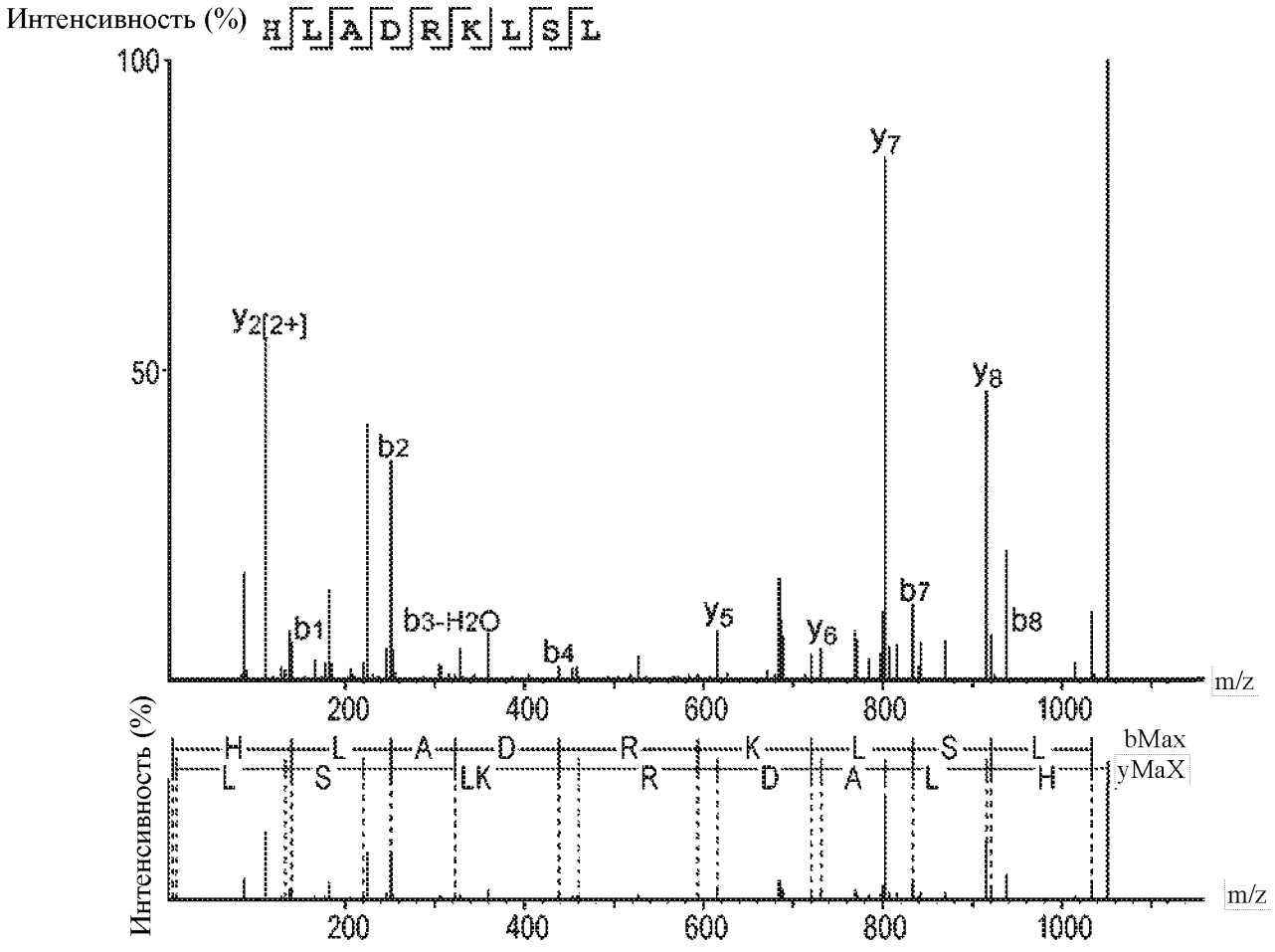
ФИГ. 1


Интенсивность (%)
V V R G G A G F A A R
100
50
y10
y3
b7
y9
y1
y2
y4
b5
b6
y8
b8
y9-NH3
m/z
200
400
600
800
1000
Интенсивность (%)
VV R G G A G F AAR
R A A F G A G G R V V
bMax
yMax
m/z
200
400
600
800
1000

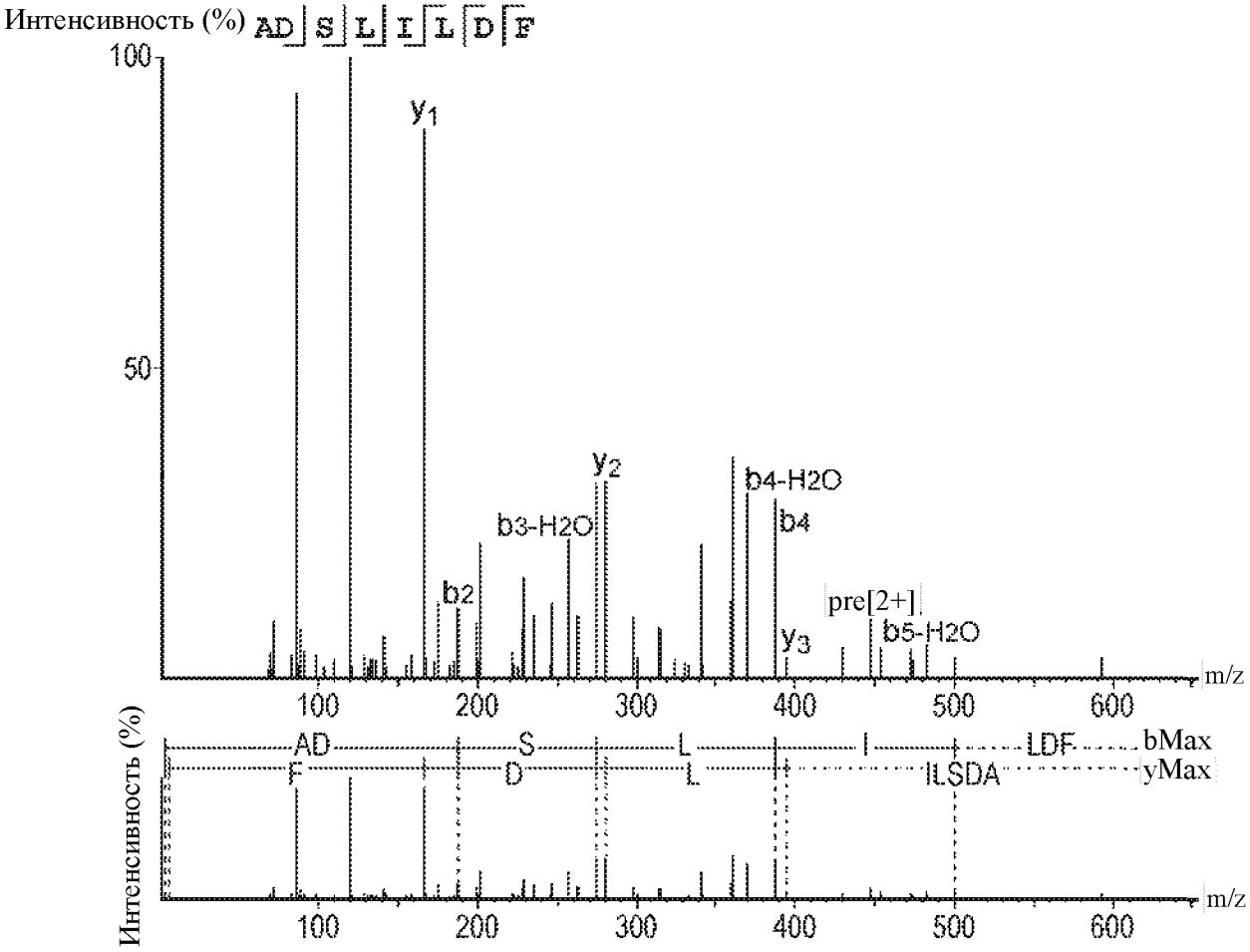
ФИГ. 2


Интенсивность (%)
H L A D RK L S L
100
50
y2[2+]
pre[1+]
y1
b2
y7
b8
b7
b6
y5
b3-H2O
b4
m/z
200
400
600
800
1000
1200
Интенсивность (%)
H L AD RK L S L
bMax
L S LKR D A L H
yMax
m/z
200
400
600
800
1000
1200

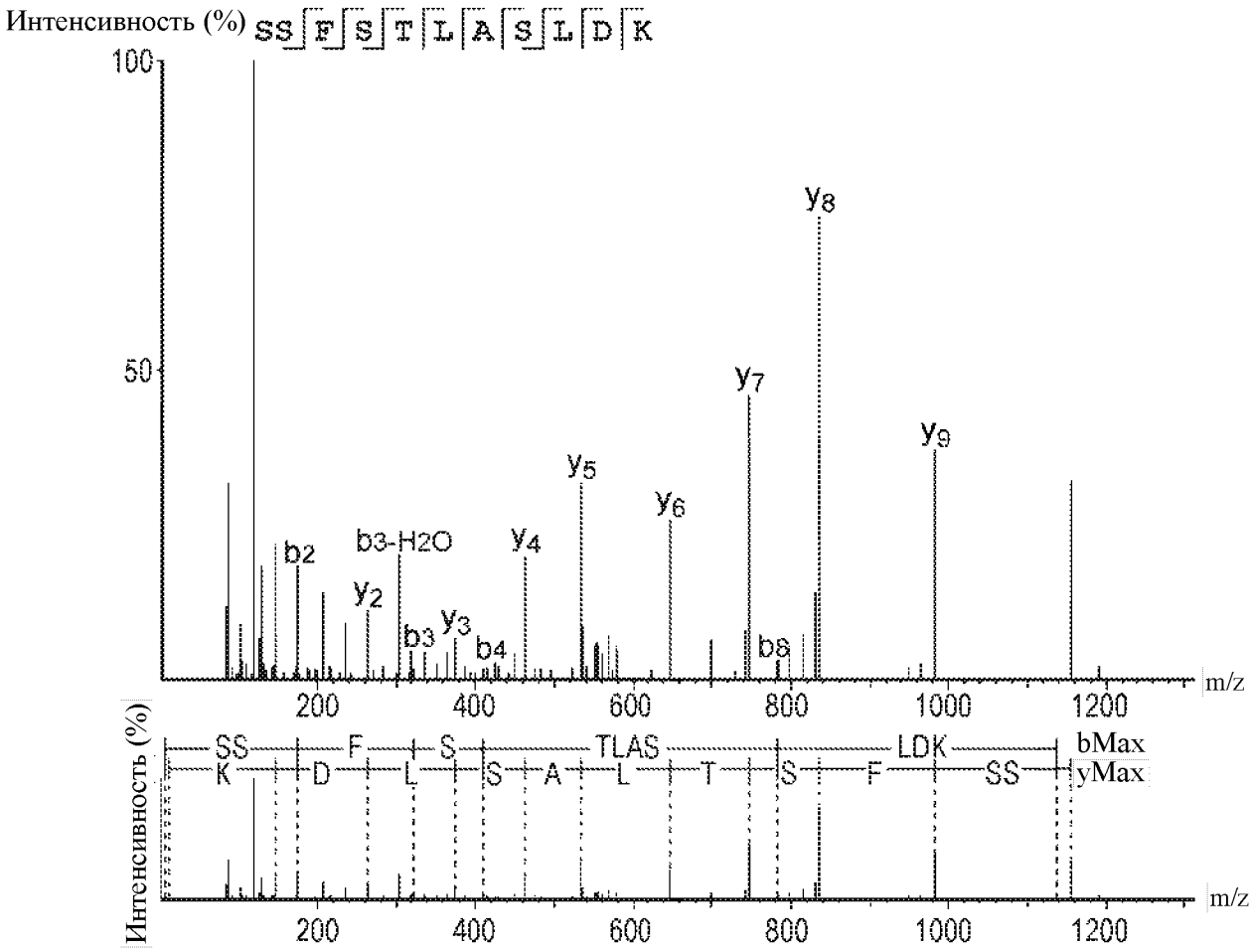
ФИГ. 3


Интенсивность (%)
H L A D R K L S L
100
50
y2[2+]
b2
b1
b3-H2O
b4
y5
y6
y7
b7
y8
b8
m/z
200
400
600
800
1000
Интенсивность (%)
H L A D R K L S L
L S LK R D A L H
bMax
yMaX
m/z
200
400
600
800
1000

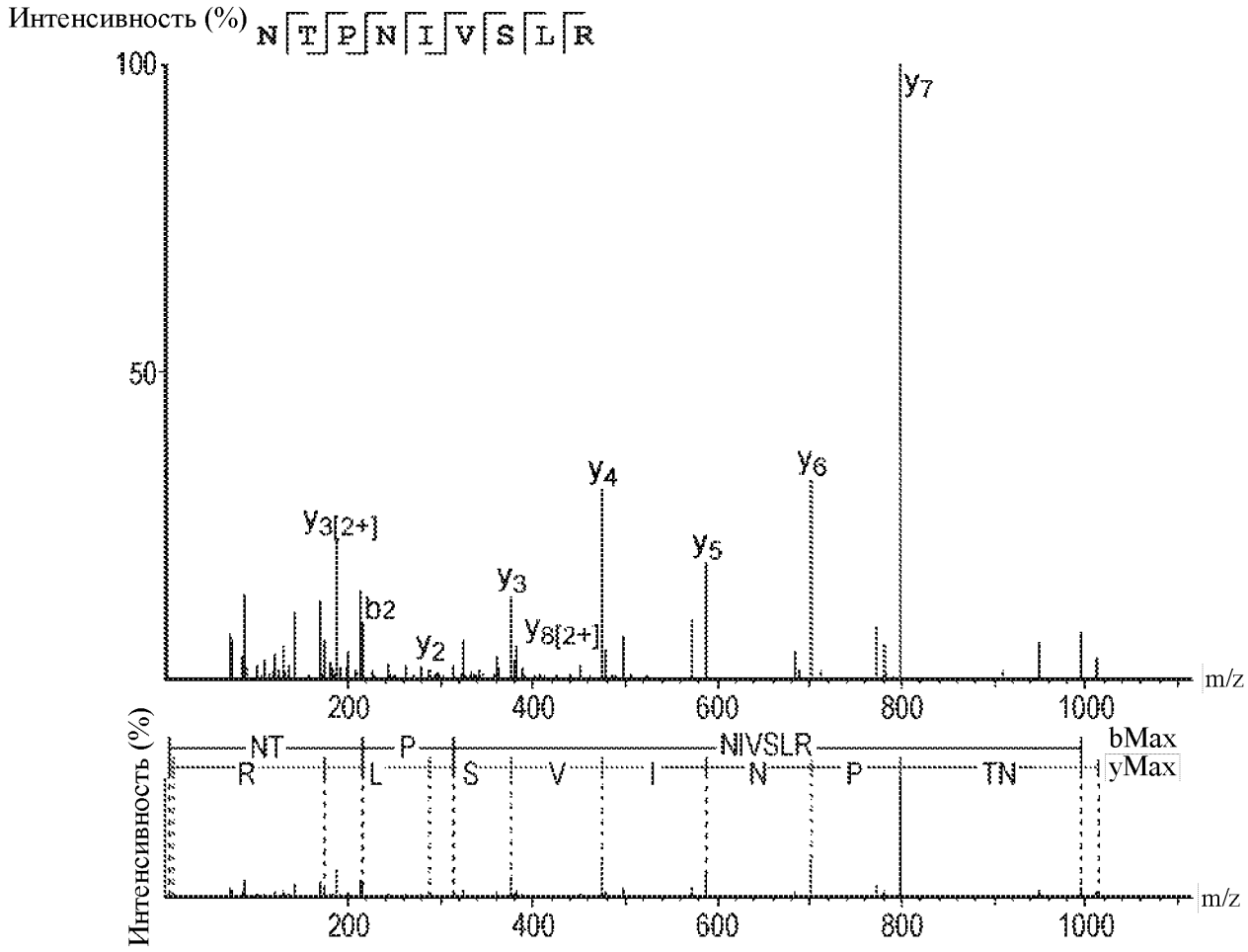
ФИГ. 4


Интенсивность (%)
AD S L I L D F
100
50
y1
y2
b4-H2O
b3-H2O
b4
b2
pre[2+]
b5-H2O
y3
m/z
100
200
300
400
500
600
Интенсивность (%)
AD
S
L
I
LDF
bMax
F
D
L
ILSDA
yMax
m/z
100
200
300
400
500
600

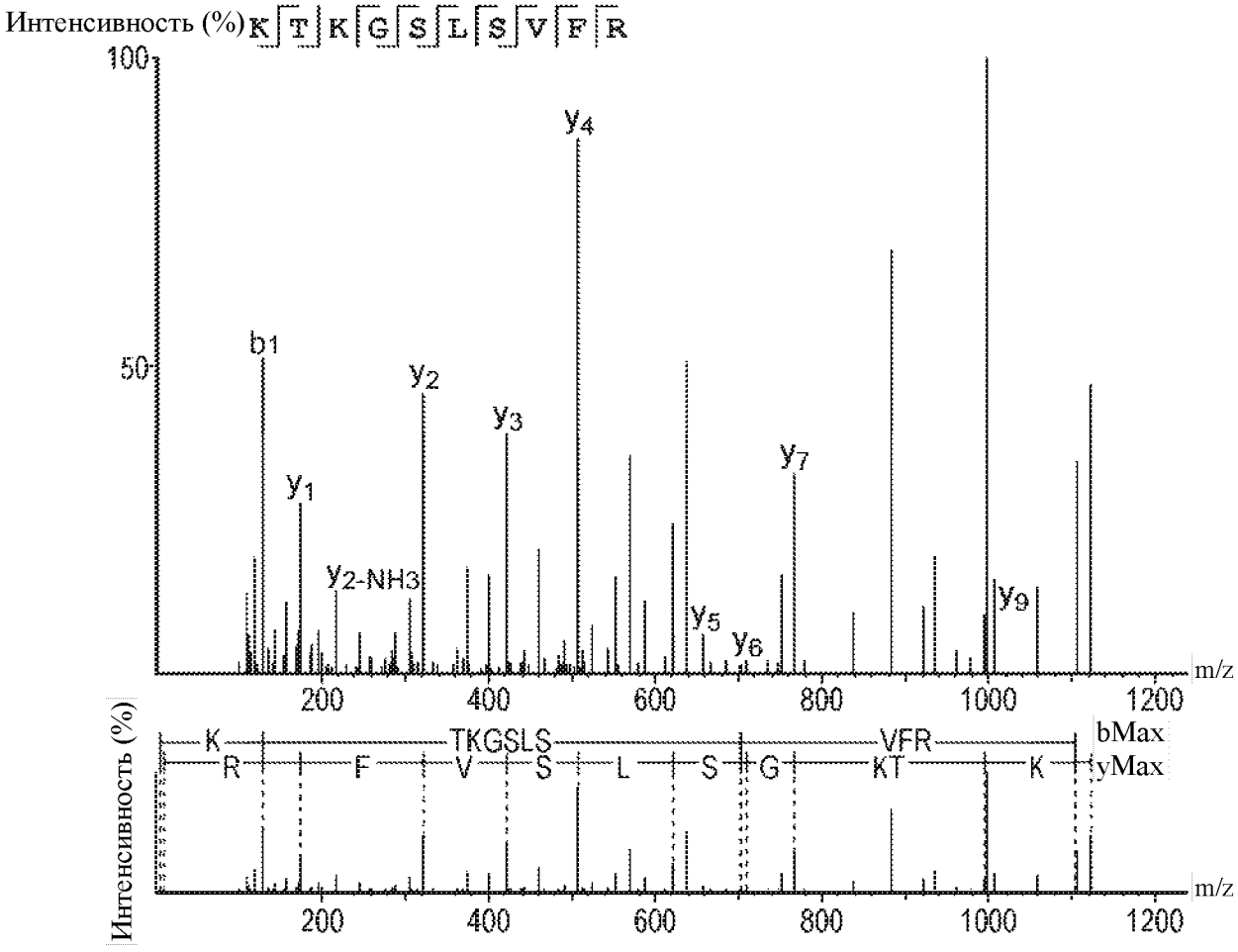
ФИГ. 5


Интенсивность (%)
SSFSTLASLDK
100
50
y8
y7
y9
y5
y6
b2
b3-H2O
y4
y2
b3
y3
b4
b8
m/z
200
400
600
800
1000
1200
Интенсивность (%)
SS F S TLAS LDK bMax
K D L S A L T S F SS yMax
m/z
200
400
600
800
1000
1200

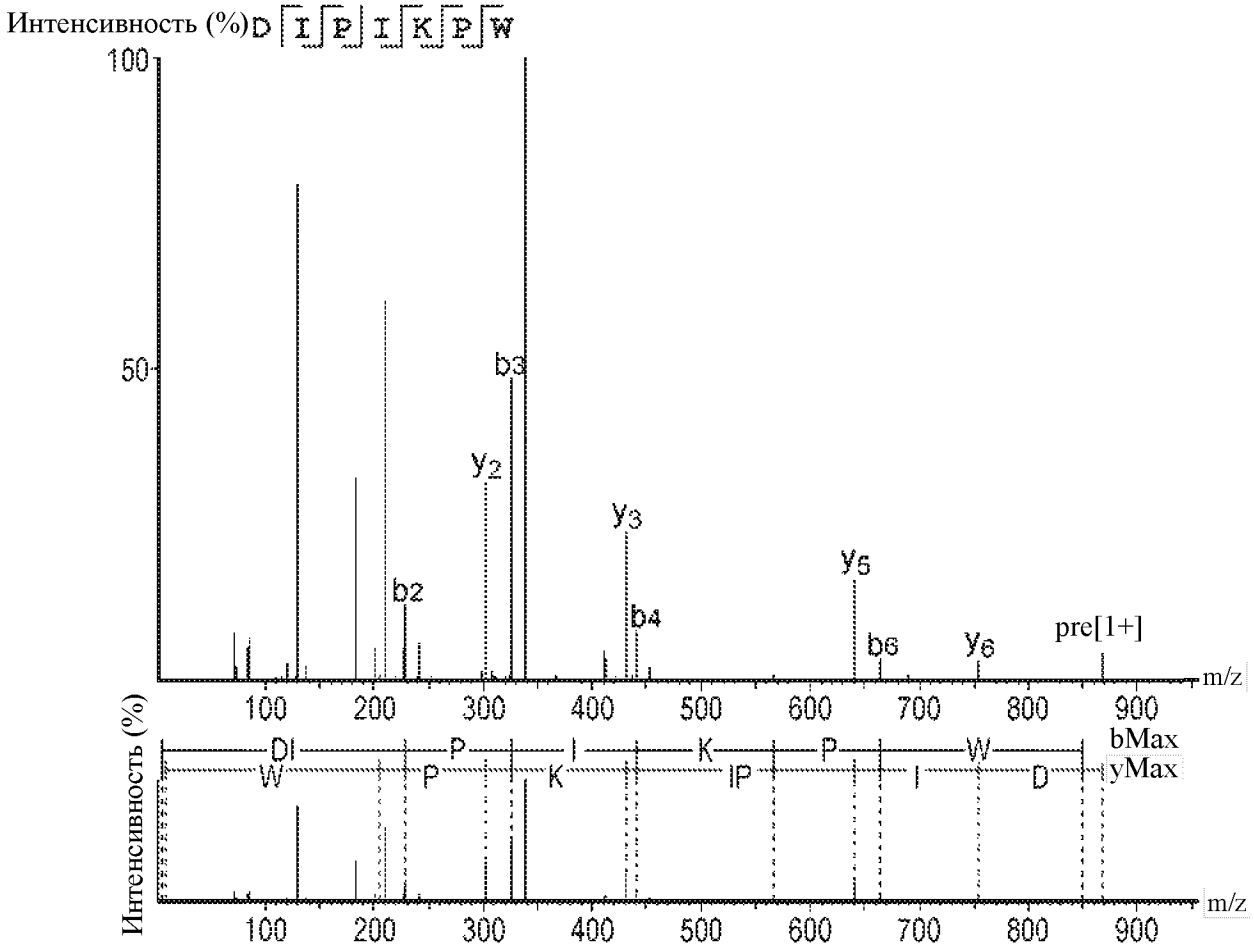
ФИГ. 6


Интенсивность (%)
N T P N I V S L R
100
50
y7
y6
y4
y5
y3[2+]
y3
b2
y2
y8[2+]
m/z
200
400
600
800
1000
Интенсивность (%)
NT
P
NIVSLR
bMax
R
L
S
V
I
N
P
TN
yMax
m/z
200
400
600
800
1000

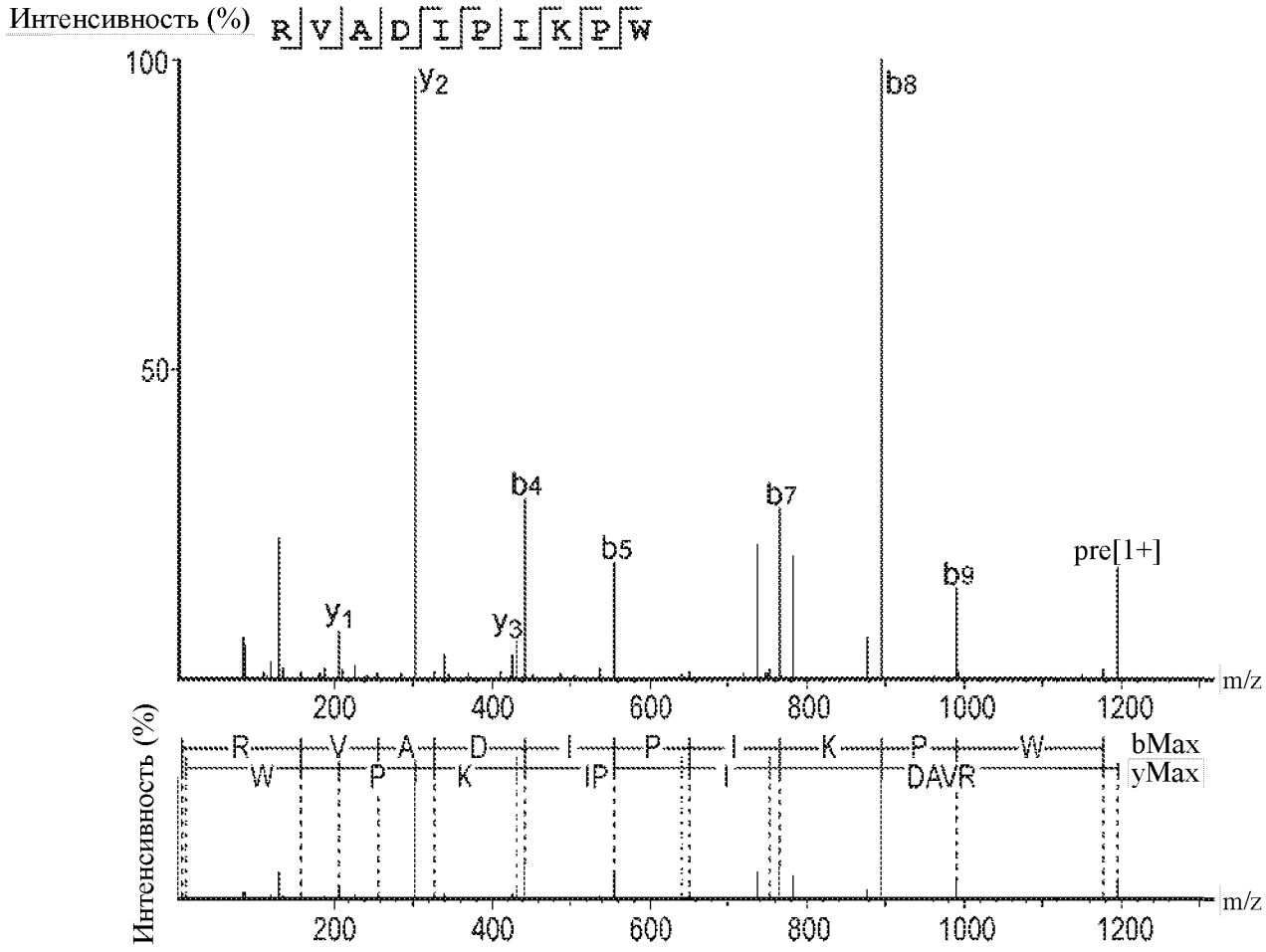
ФИГ. 7


Интенсивность (%)
K T K G S L S V F R
100
50
b1
y1
y2
y3
y4
y2-NH3
y5
y6
y7
y9
m/z
200
400
600
800
1000
1200
K
TKGSLS
VFR
bMax
R
F
V
S
L
S
G
KT
K
yMax
Интенсивность (%)
m/z
200
400
600
800
1000
1200

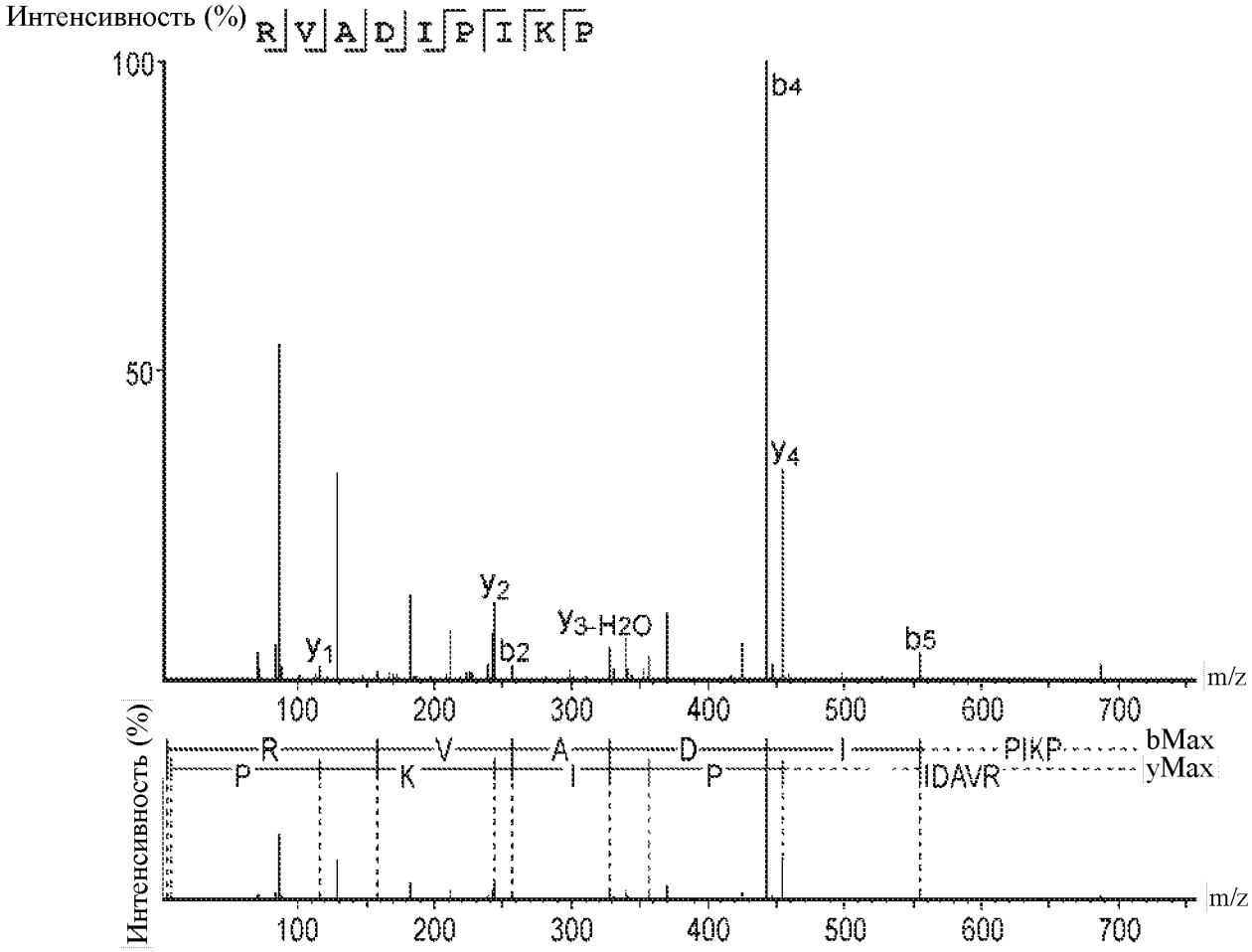
ФИГ. 8


Интенсивность (%)
D I P I K P W
100
50
b3
y2
y3
y5
b2
b4
b6
y6
pre[1+]
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Интенсивность (%)
DI
P
I
K
P
W
bMax
W
P
K
IP
I
D
yMax
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900

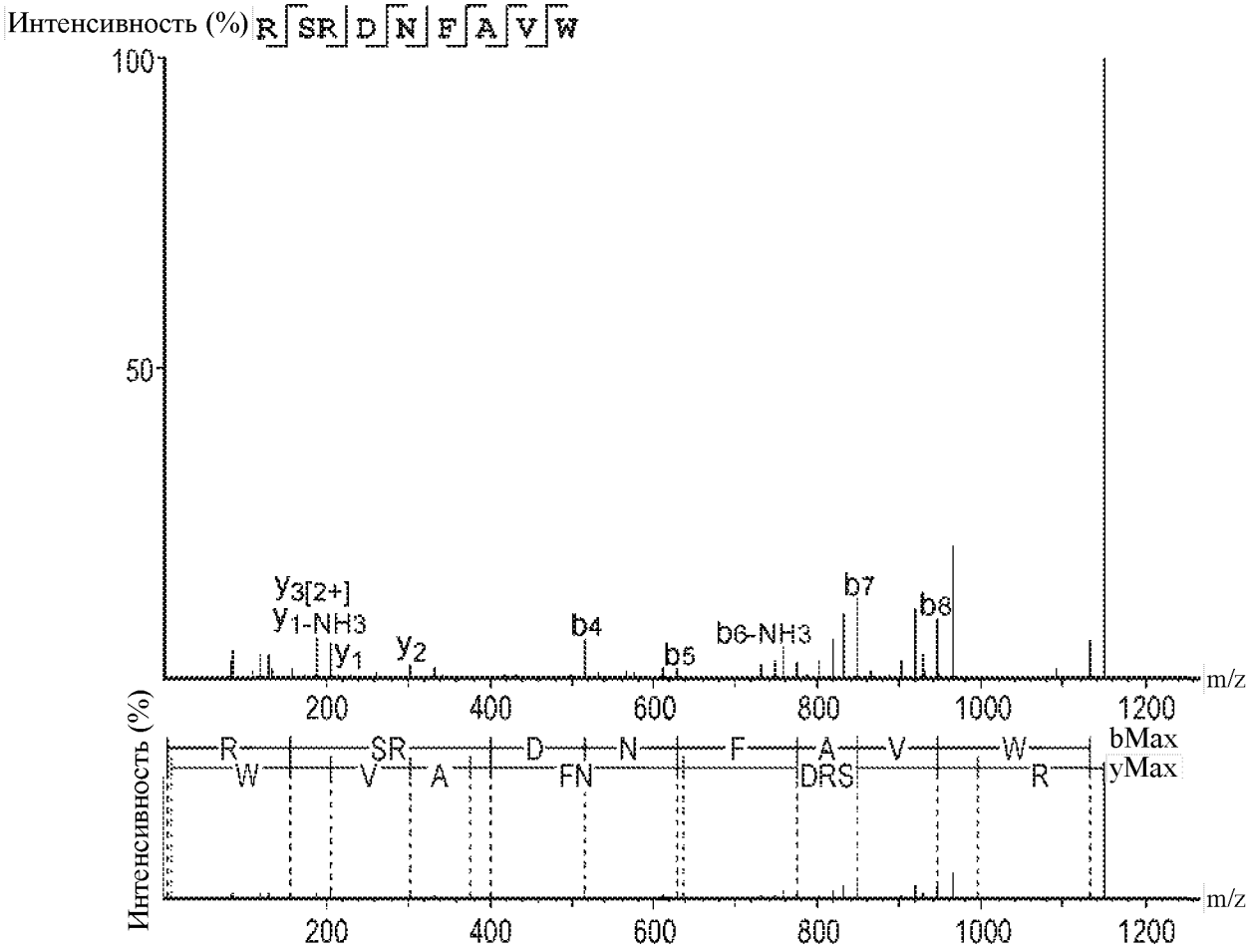
ФИГ. 9


Интенсивность (%)
R V A D I P I K P W
100
50
y2
b8
b4
b7
b5
pre[1+]
b9
y1
y3
m/z
200
400
600
800
1000
1200
Интенсивность (%)
R V A D I P I K P W
W P K IP I DAVR
bMax
yMax
m/z
200
400
600
800
1000
1200

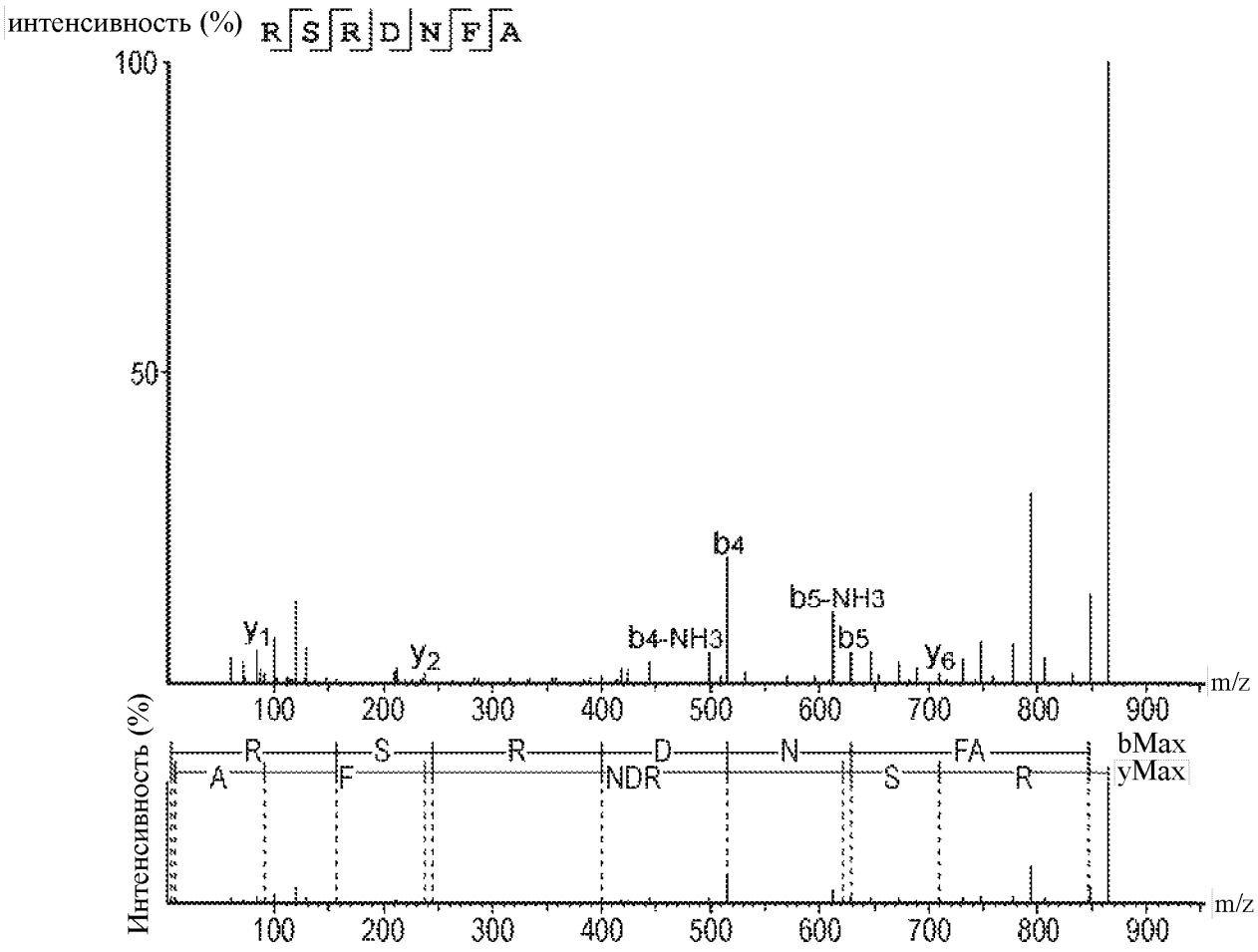
ФИГ. 10


Интенсивность (%)
R V A D I P I K P
100
50
b4
y4
y2
y3-H2O
y1
b2
b5
m/z
100
200
300
400
500
600
700
Интенсивность (%)
R V A D I PIKP
P K I P IDAVR
bMax
yMax
m/z
100
200
300
400
500
600
700

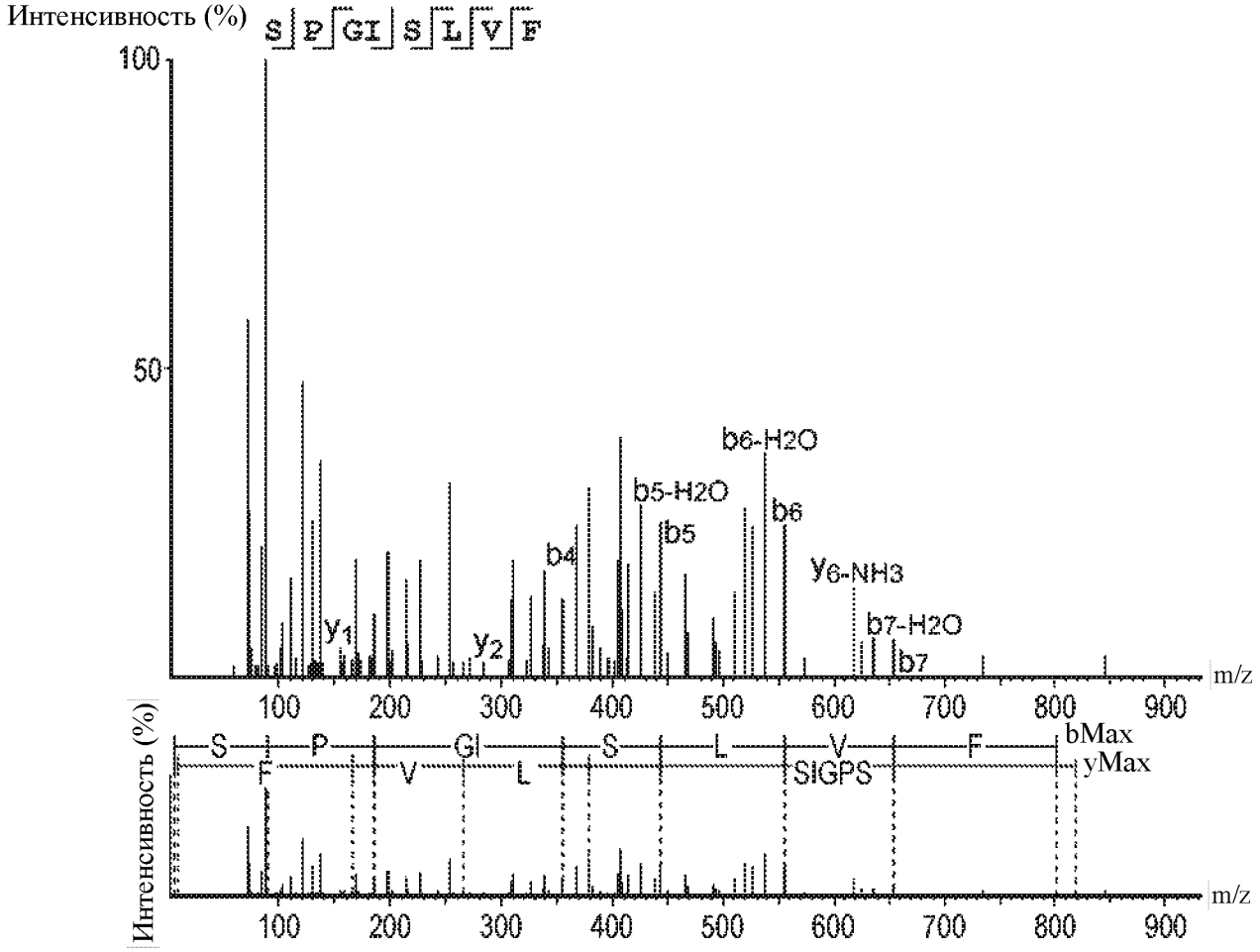
ФИГ. 11


Интенсивность (%)
R SR D N F A V W
100
50
y3[2+]
y1-NH3
y1
y2
b4
b5
b6-NH3
b7
b8
m/z
200
400
600
800
1000
1200
Интенсивность (%)
R SR D N F A V W
W V A FN DRS R
bMax
yMax
m/z
200
400
600
800
1000
1200

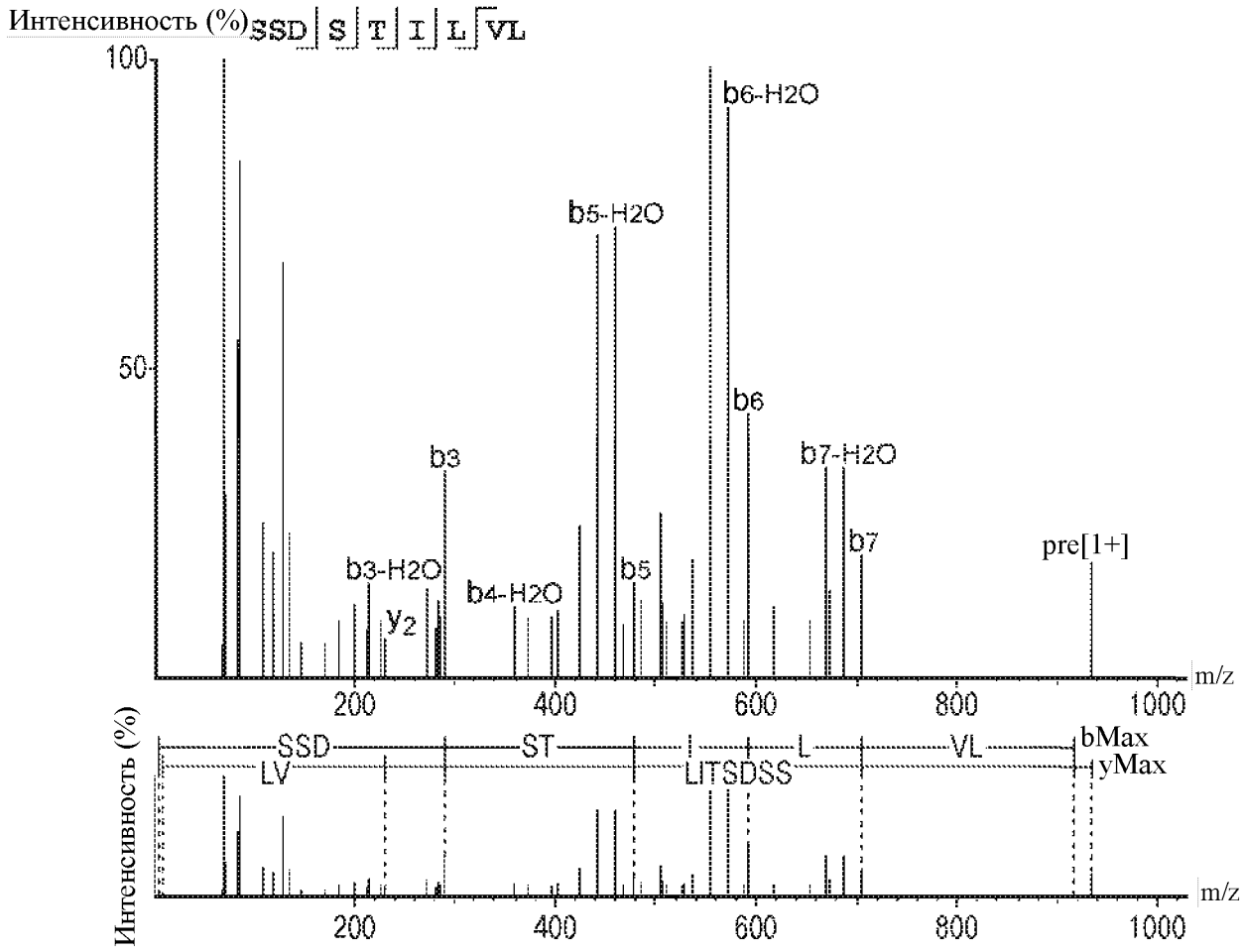
ФИГ. 12


интенсивность (%)
R S R D N F A
100
50
b4
b5-NH3
y1
y2
b4-NH3
b5
y6
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Интенсивность (%)
R
S
R
D
N
FA
bMax
A
F
NDR
S
R
yMax
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900

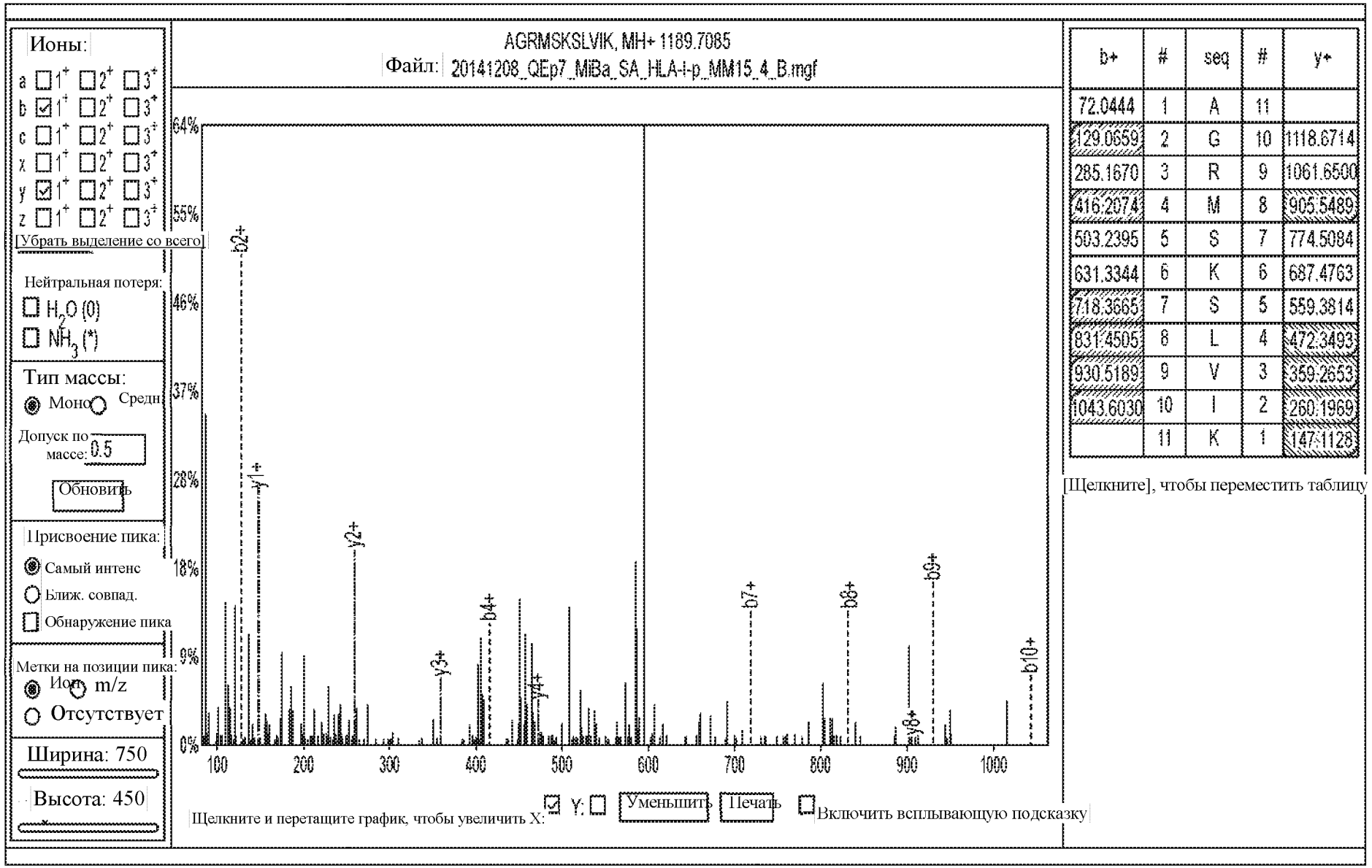
ФИГ. 13


Интенсивность (%)
S P GI S L V F
100
50
b6-H2O
b5-H2O
b6
b5
b4
y6-NH3
b7-H2O
b7
y1
y2
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Интенсивность (%)
S P GI S L V F
F V L SIGPS
bMax
yMax
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900

ФИГ. 14

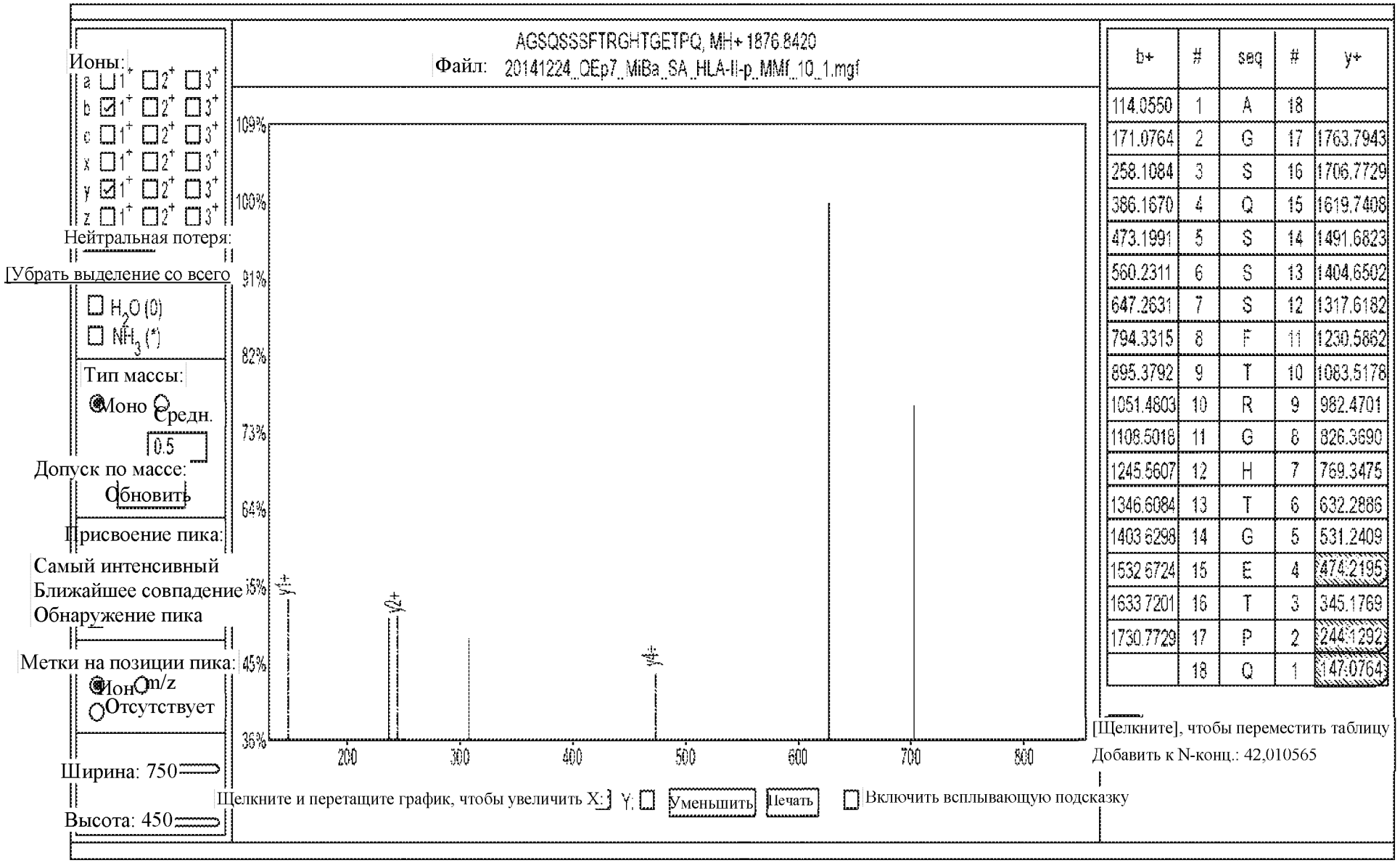

Интенсивность (%)
SSD S T I L VL
100
50
b6-H2O
b5-H2O
b6
b3
b7-H2O
b7
pre[1+]
b3-H2O
b4-H2O
b5
y2
m/z
200
400
600
800
1000
Интенсивность (%)
SSD
ST
L
VL
bMax
LV
LITSDSS
yMax
m/z
200
400
600
800
1000

ФИГ. 15

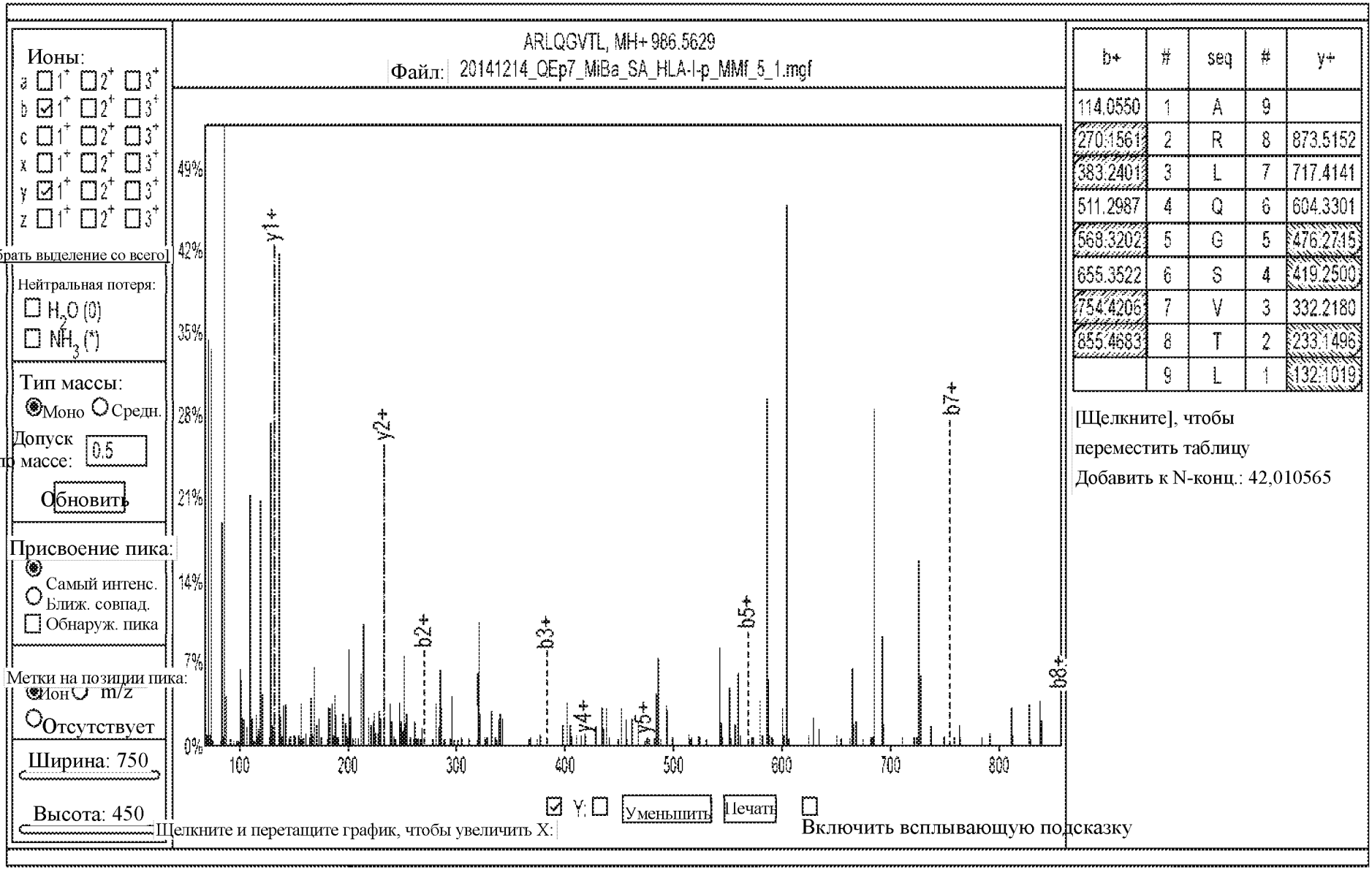



| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 72.0444 | 1 | A | 11 | |
| 129.0659 | 2 | G | 10 | 1118.6714 |
| 285.1670 | 3 | R | 9 | 1061.6500 |
| 416.2074 | 4 | M | 8 | 905.5489 |
| 503.2395 | 5 | S | 7 | 774.5084 |
| 631.3344 | 6 | K | 6 | 687.4763 |
| 718.3665 | 7 | S | 5 | 559.3814 |
| 831.4505 | 8 | L | 4 | 472.3493 |
| 930.5169 | 9 | V | 3 | 359.2653 |
| 1043.6030 | 10 | I | 2 | 260.1969 |
| | 11 | K | 1 | 147.1128 |

ФИГ. 16


AGSQSSSFTRGHTGETPQ, MH+ 1876.8420
Файл: 20141224_QEp7_MiBa_SA_HLA-II-p_MMf_10_1.mgf
Ионы:
a 1+ 2+ 3+
b 1+ 2+ 3+
c 1+ 2+ 3+
x 1+ 2+ 3+
y 1+ 2+ 3+
z 1+ 2+ 3+
Нейтральная потеря:
Убрать выделение со всего
H2O (0)
NH3 (*)
Тип массы:
Моно Средн.
0.5
Допуск по массе:
Обновить
Присвоение пика:
Самый интенсивный
Ближайшее совпадение
Обнаружение пика
Метки на позиции пика:
Ион m/z
Отсутствует
Ширина: 750
Высота: 450
109%
100%
91%
82%
73%
64%
55%
45%
36%
200
300
400
500
600
700
800
y1+
y2+
y4+
b+ # seq # y+
114.0550 1 A 18
171.0764 2 G 17 1763.7943
258.1084 3 S 16 1706.7729
386.1670 4 Q 15 1619.7408
473.1991 5 S 14 1491.6823
560.2311 6 S 13 1404.6502
647.2631 7 S 12 1317.6182
794.3315 8 F 11 1230.5862
895.3792 9 T 10 1083.5178
1051.4803 10 R 9 982.4701
1108.5018 11 G 8 826.3690
1245.5607 12 H 7 769.3475
1346.6084 13 T 6 632.2886
1403.6298 14 G 5 531.2409
1532.6724 15 E 4 474.2195
1633.7201 16 T 3 345.1769
1730.7729 17 P 2 244.1292
18 Q 1 147.0764
[Щелкните], чтобы переместить таблицу
Добавить к N-конц.: 42,010565
Щелкните и перетащите график, чтобы увеличить X: Y:
Уменьшить
Печать
Включить всплывающую подсказку

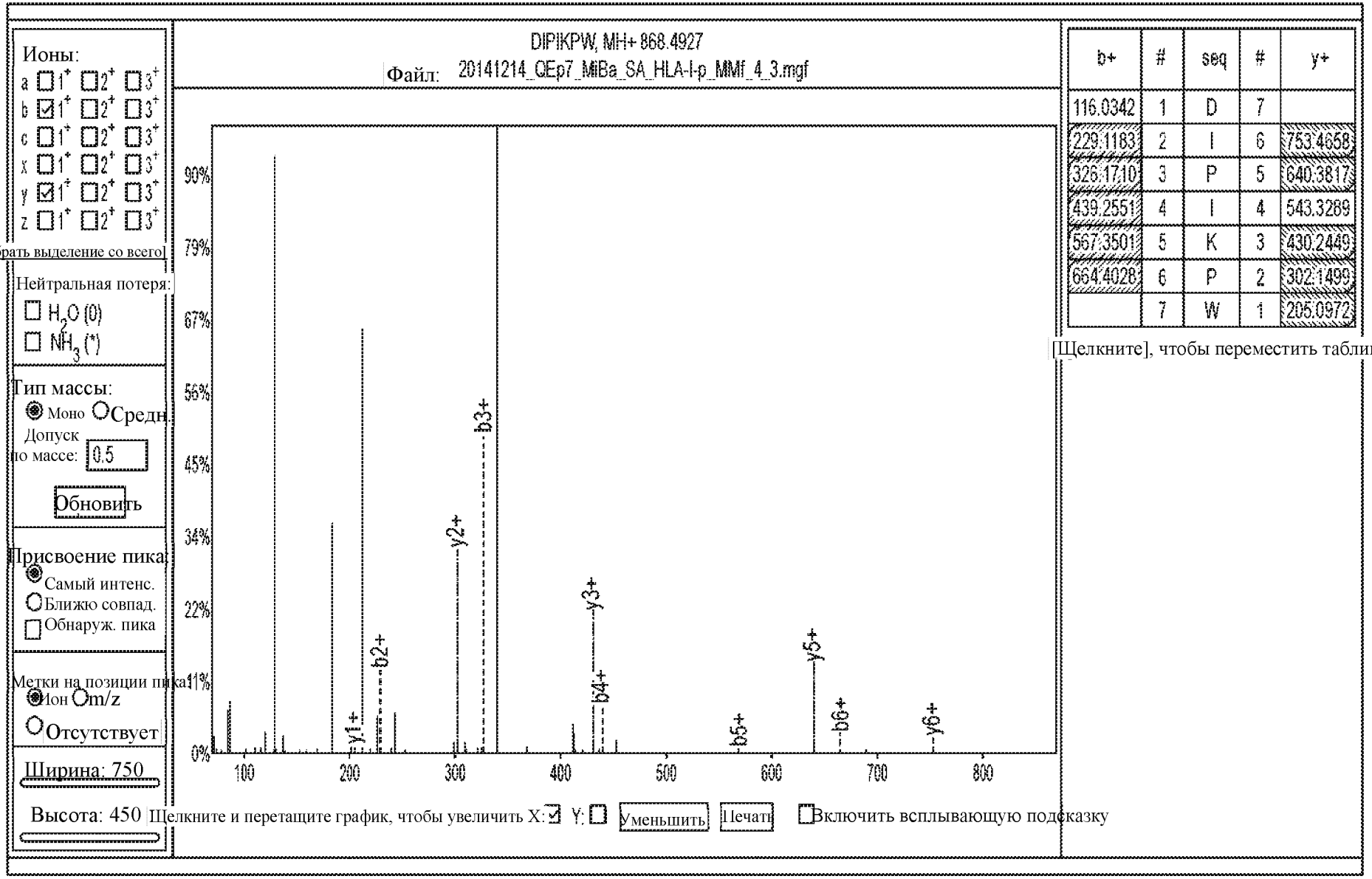
ФИГ. 17



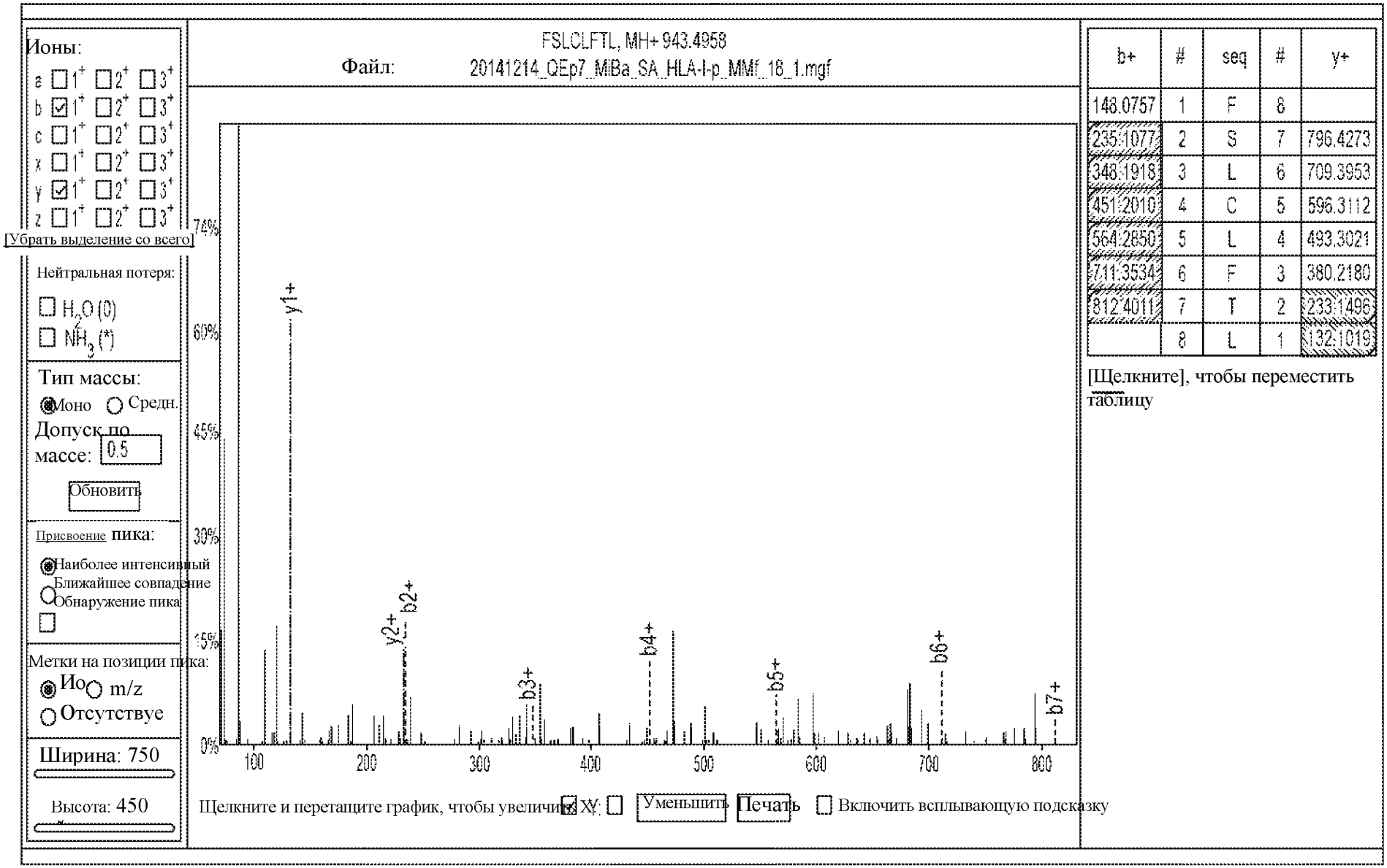

| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 114.0550 | 1 | A | 9 | |
| 270.1561 | 2 | R | 8 | 873.5152 |
| 383.2401 | 3 | L | 7 | 717.4141 |
| 511.2987 | 4 | Q | 6 | 604.3301 |
| 568.3202 | 5 | G | 5 | 476.2715 |
| 655.3522 | 6 | S | 4 | 419.2500 |
| 754.4206 | 7 | V | 3 | 332.2180 |
| 855.4683 | 8 | T | 2 | 233.1496 |
| | 9 | L | 1 | 132.1019 |



ФИГ. 18

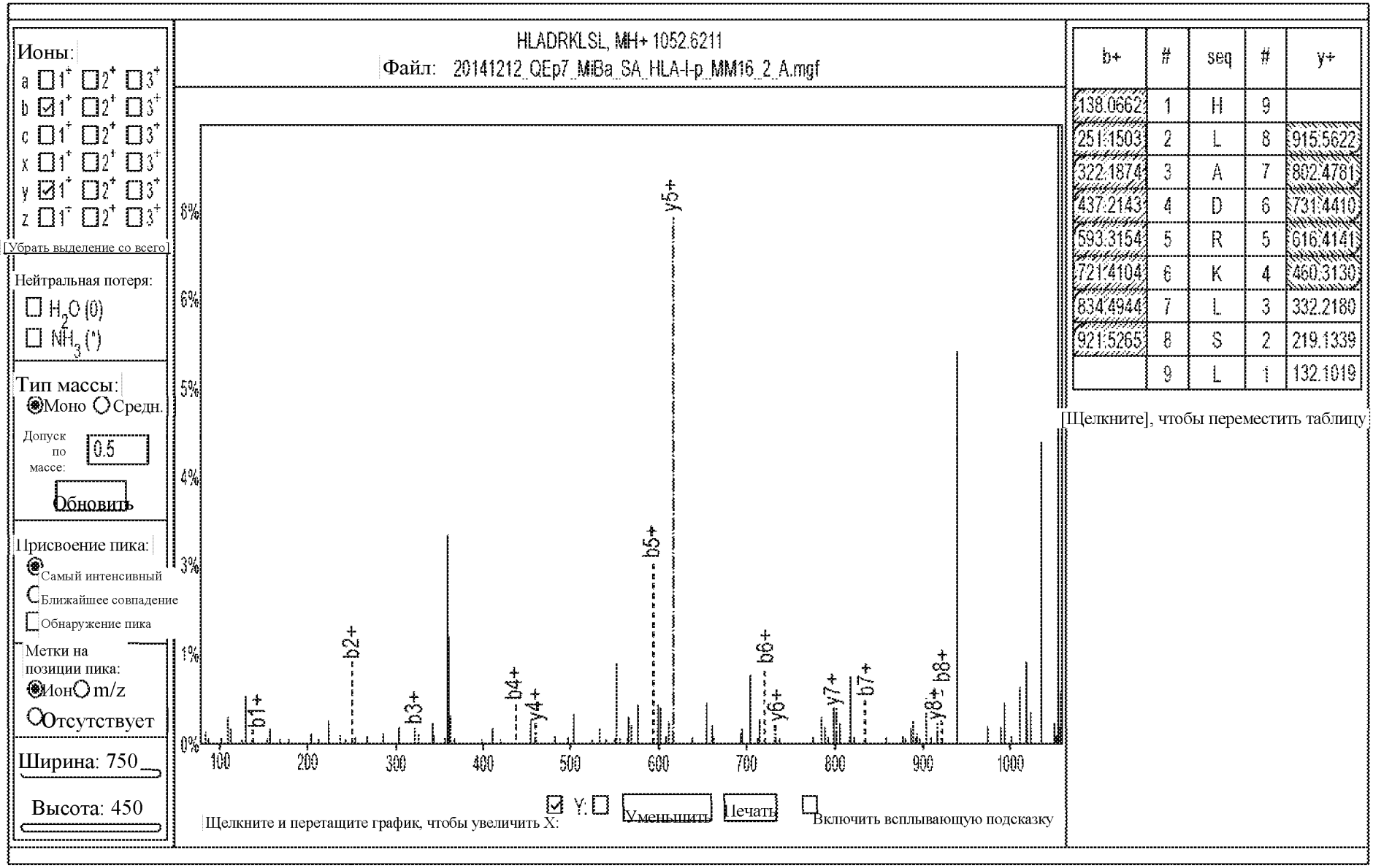

Ионы:
a 1+ 2+ 3+
b 1+ 2+ 3+
c 1+ 2+ 3+
x 1+ 2+ 3+
y 1+ 2+ 3+
z 1+ 2+ 3+
[Убрать выделение со всего]
Нейтральная потеря:
H2O (0)
NH3 (*)
Тип массы:
Моно Средн.
Допуск по массе: 0.5
Обновить
Присвоение пика:
Самый интенс.
Ближю совпад.
Обнаруж. пика
Метки на позиции пика:
Ион m/z
Отсутствует
Ширина: 750
Высота: 450
DIPIKPW, MH+ 868.4927
Файл: 20141214_QEp7_MiBa_SA_HLA-I-p_MMf_4_3.mgf
90%
79%
67%
56%
45%
34%
22%
11%
0%
100
200
300
400
500
600
700
800
y1+
b2+
y2+
b3+
y3+
b4+
b5+
y5+
b6+
y6+
Щелкните и перетащите график, чтобы увеличить X: Y: Уменьшить Печать Включить всплывающую подсказку
b+ # seq # y+
116.0342 1 D 7
229.1183 2 I 6 753.4658
326.17.10 3 P 5 640.3817
439.2551 4 I 4 543.3289
567.3501 5 K 3 430.2449
664.4028 6 P 2 302.1499
7 W 1 205.0972
[Щелкните], чтобы переместить таблицу

ФИГ. 19




| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 148.0757 | 1 | F | 8 | |
| 235.1077 | 2 | S | 7 | 796.4273 |
| 348.1918 | 3 | L | 6 | 709.3953 |
| 451.2010 | 4 | C | 5 | 596.3112 |
| 564.2850 | 5 | L | 4 | 493.3021 |
| 711.3534 | 6 | F | 3 | 380.2180 |
| 812.4011 | 7 | T | 2 | 233.1496 |
| | 8 | L | 1 | 132.1019 |

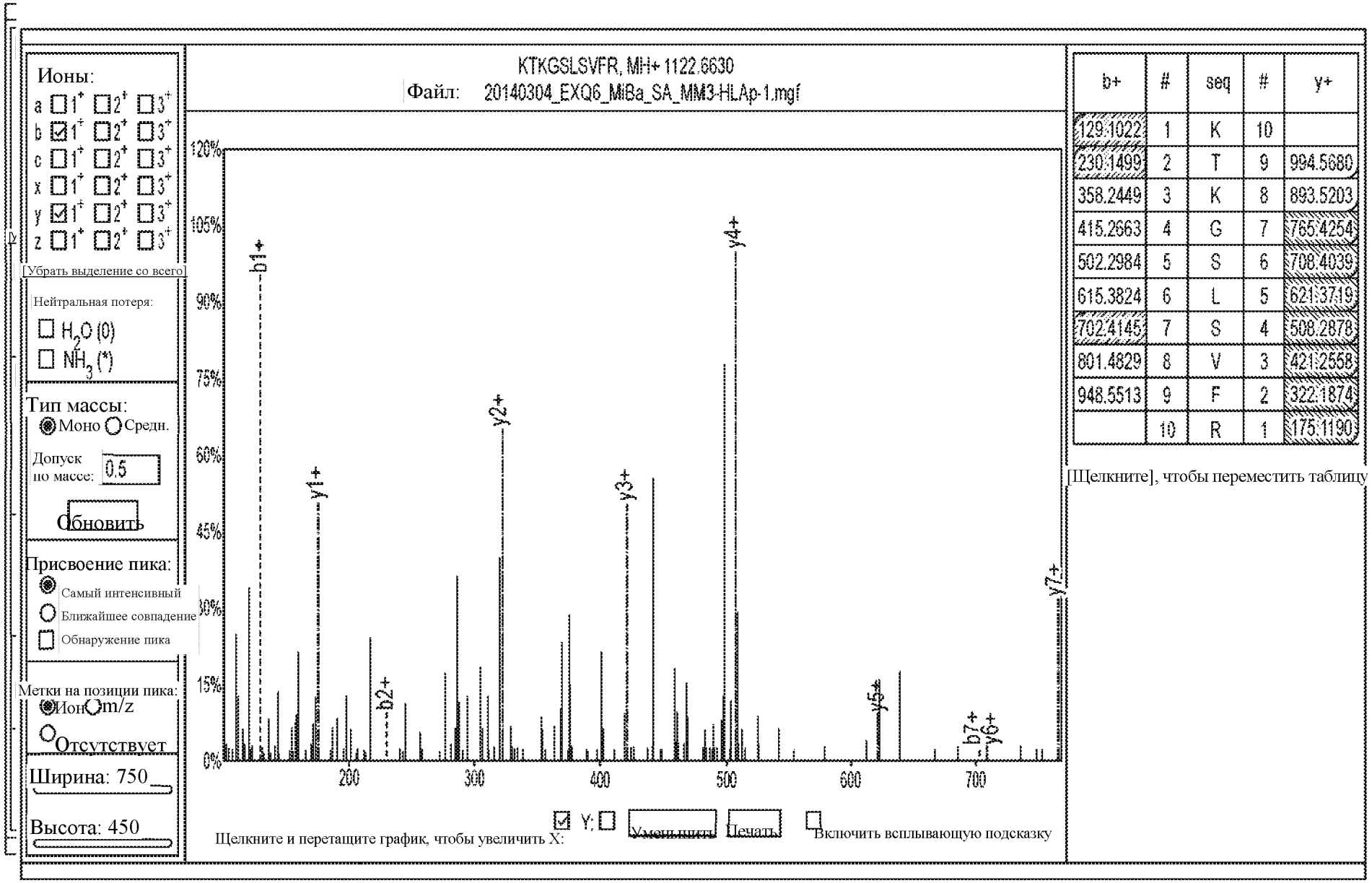
ФИГ. 20



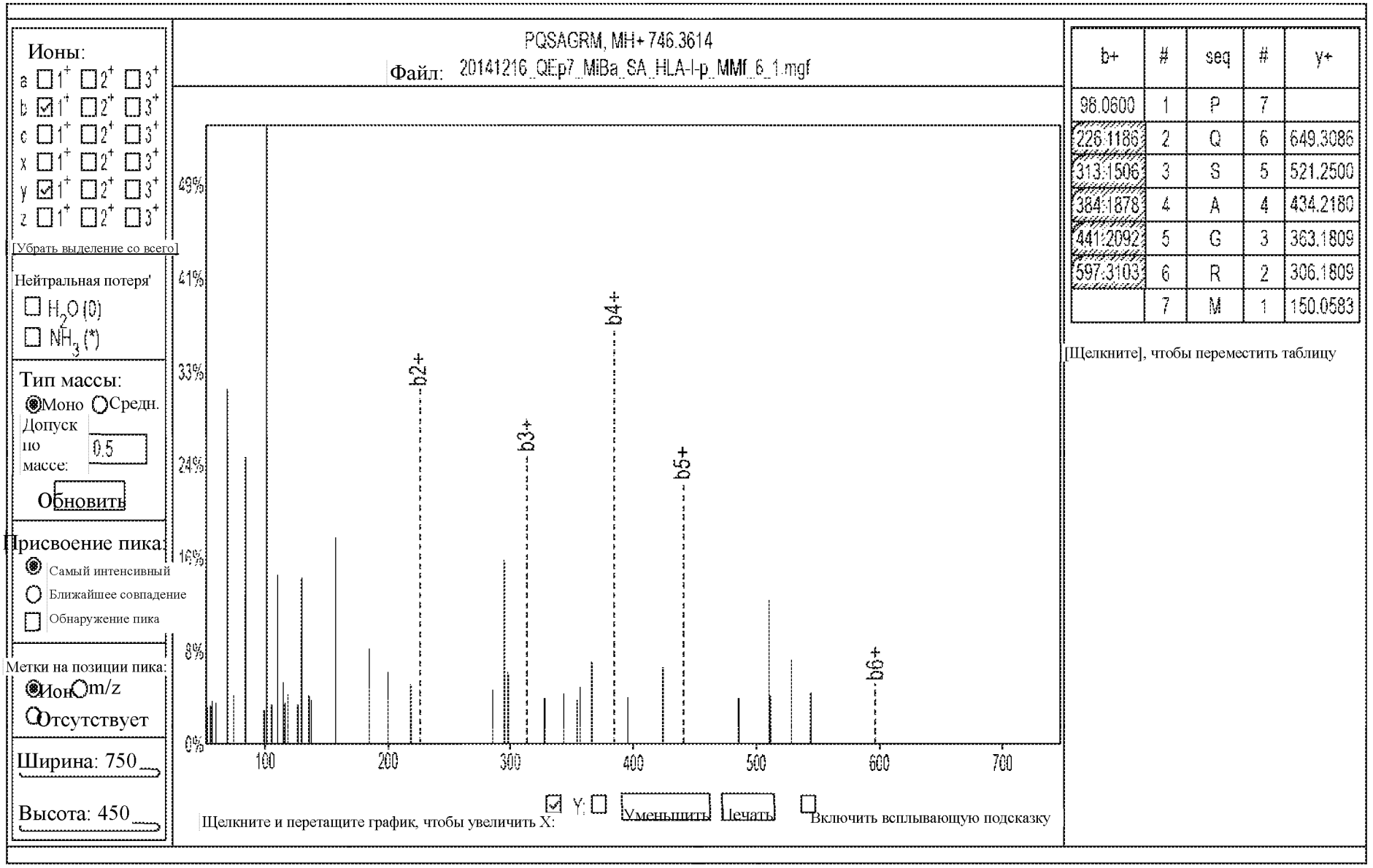

| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 138.0662 | 1 | H | 9 | |
| 251.1503 | 2 | L | 8 | 915.5622 |
| 322.1874 | 3 | A | 7 | 802.4781 |
| 437.2143 | 4 | D | 6 | 731.4410 |
| 593.3154 | 5 | R | 5 | 616.4141 |
| 721.4104 | 6 | K | 4 | 460.3130 |
| 834.4944 | 7 | L | 3 | 332.2180 |
| 921.5265 | 8 | S | 2 | 219.1339 |
| | 9 | L | 1 | 132.1019 |



ФИГ. 21


Ионы:
a 1+ 2+ 3+
b 1+ 2+ 3+
c 1+ 2+ 3+
x 1+ 2+ 3+
y 1+ 2+ 3+
z 1+ 2+ 3+
[Убрать выделение со всего]
Нейтральная потеря:
H2O (0)
NH3 (*)
Тип массы:
Моно Средн.
Допуск по массе: 0.5
Обновить
Присвоение пика:
Самый интенсивный
Ближайшее совпадение
Обнаружение пика
Метки на позиции пика:
Ион m/z
Отсутствует
Ширина: 750
Высота: 450
KTKGSLSVFR, MH+ 1122.6630
Файл: 20140304_EXQ6_MiBa_SA_MM3-HLAp-1.mgf
120%
105%
90%
75%
60%
45%
30%
15%
0%
200
300
400
500
600
700
b1+
y1+
b2+
y2+
y3+
y4+
y5+
b7+
y6+
y7+
Щелкните и перетащите график, чтобы увеличить X:
Y:
Уменьшить
Печать
Включить всплывающую подсказку
b+ # seq # y+
129.1022 1 K 10
230.1499 2 T 9 994.5680
358.2449 3 K 8 893.5203
415.2663 4 G 7 765.4254
502.2984 5 S 6 708.4039
615.3824 6 L 5 621.3719
702.4145 7 S 4 508.2878
801.4829 8 V 3 421.2558
948.5513 9 F 2 322.1874
10 R 1 175.1190
[Щелкните], чтобы переместить таблицу

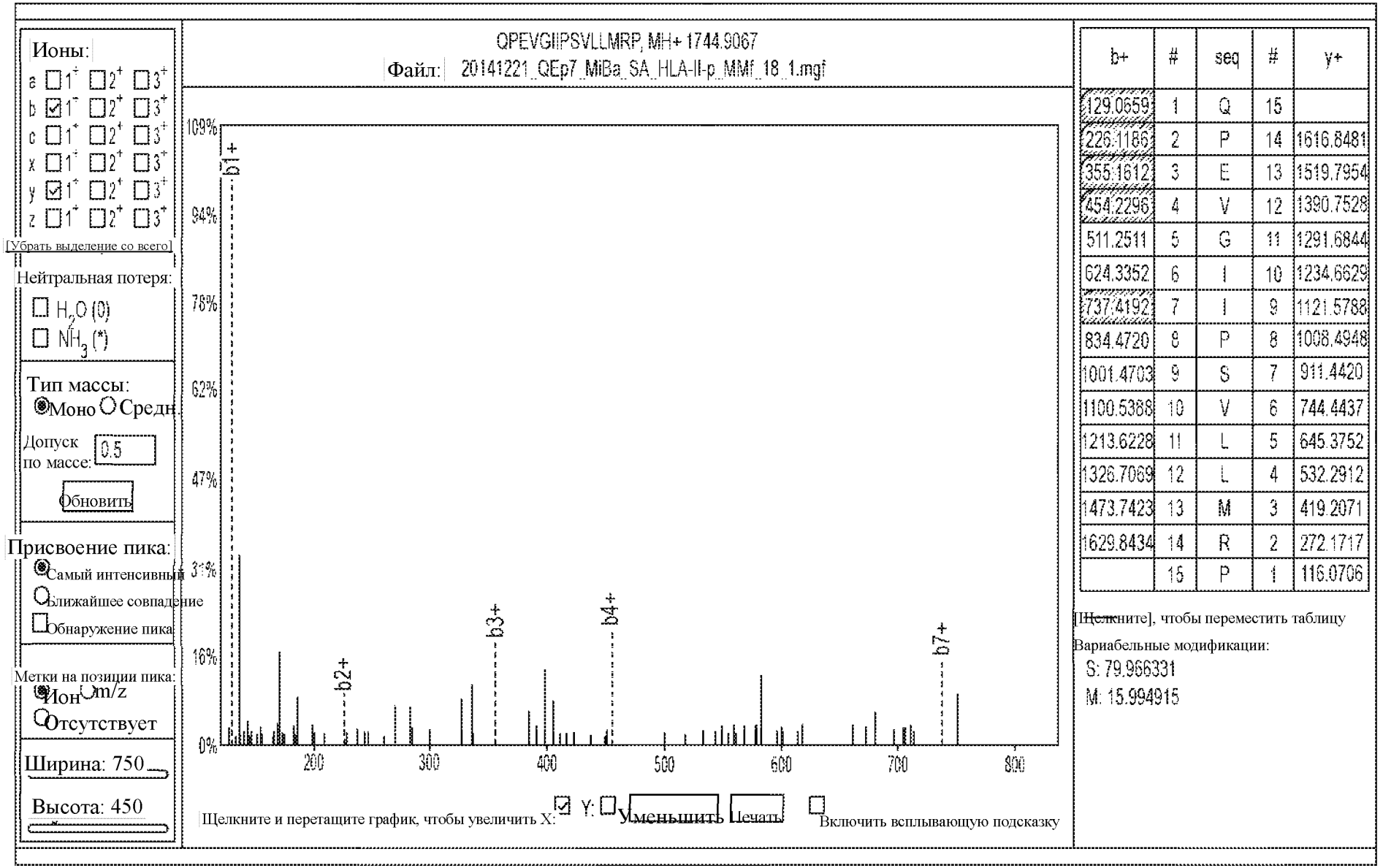
ФИГ. 22




| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 98.0600 | 1 | P | 7 | |
| 226.1186 | 2 | Q | 6 | 649.3086 |
| 313.1506 | 3 | S | 5 | 521.2500 |
| 384.1878 | 4 | A | 4 | 434.2180 |
| 441.2092 | 5 | G | 3 | 363.1809 |
| 597.3103 | 6 | R | 2 | 306.1809 |
| | 7 | M | 1 | 150.0583 |



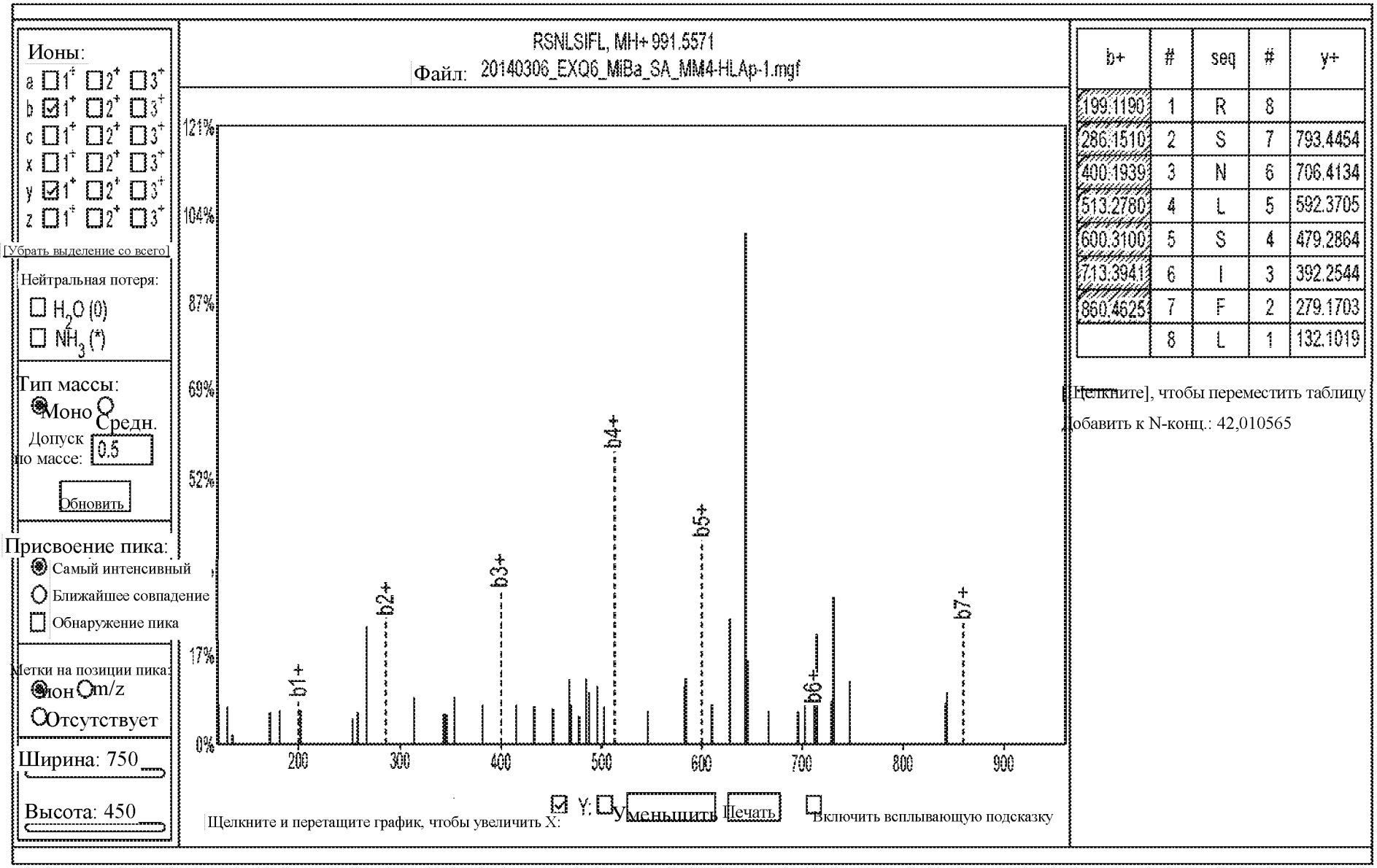
ФИГ. 23




| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 129.0659 | 1 | Q | 15 | |
| 226.1186 | 2 | P | 14 | 1616.8481 |
| 355.1612 | 3 | E | 13 | 1519.7954 |
| 454.2296 | 4 | V | 12 | 1390.7528 |
| 511.2511 | 5 | G | 11 | 1291.6844 |
| 624.3352 | 6 | I | 10 | 1234.6629 |
| 737.4192 | 7 | I | 9 | 1121.5788 |
| 834.4720 | 8 | P | 8 | 1008.4948 |
| 1001.4703 | 9 | S | 7 | 911.4420 |
| 1100.5388 | 10 | V | 6 | 744.4437 |
| 1213.6228 | 11 | L | 5 | 645.3752 |
| 1326.7069 | 12 | L | 4 | 532.2912 |
| 1473.7423 | 13 | M | 3 | 419.2071 |
| 1629.8434 | 14 | R | 2 | 272.1717 |
| | 15 | P | 1 | 116.0706 |



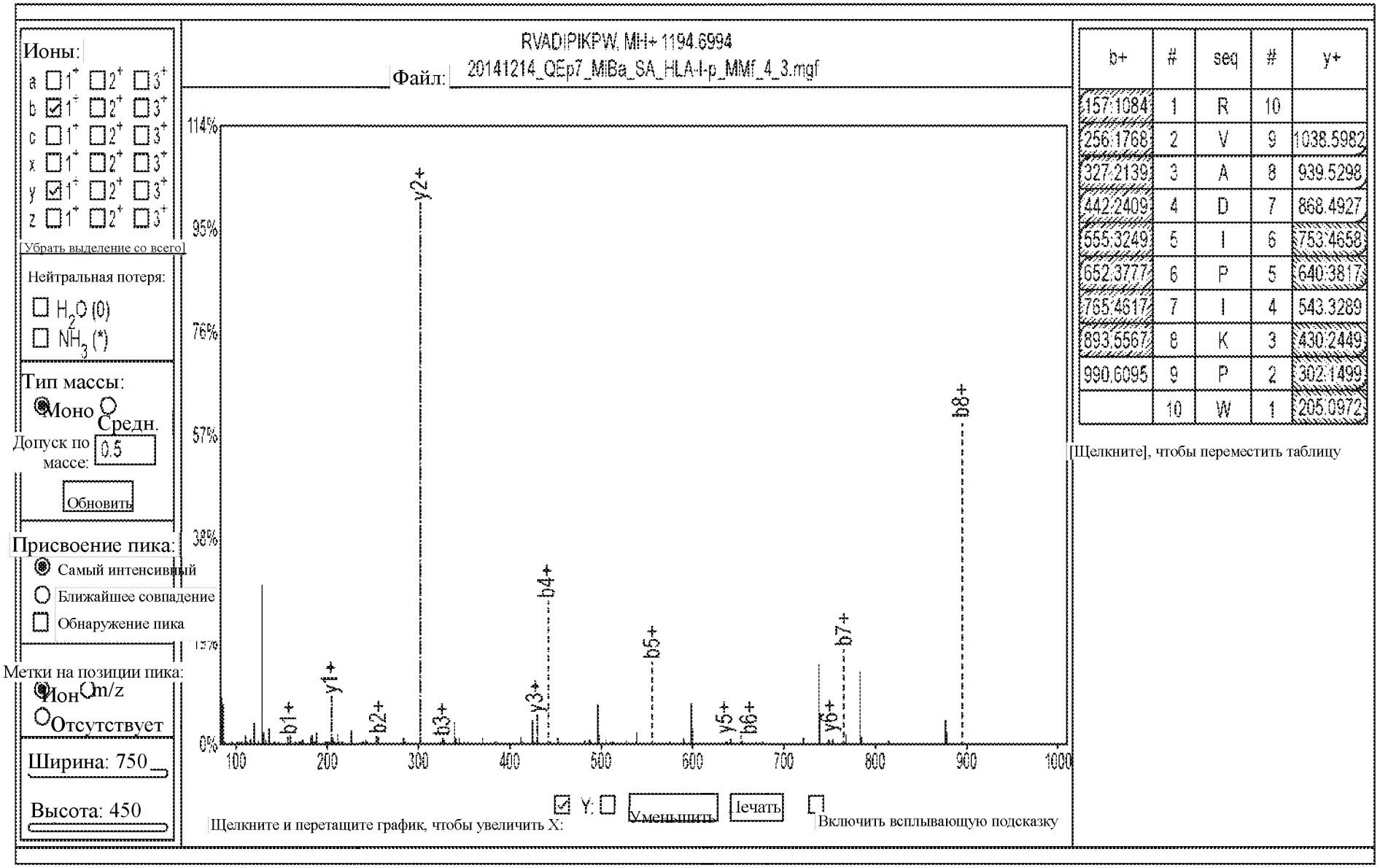
ФИГ. 24




| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 199.1190 | 1 | R | 8 | |
| 286.1510 | 2 | S | 7 | 793.4454 |
| 400.1939 | 3 | N | 6 | 706.4134 |
| 513.2780 | 4 | L | 5 | 592.3705 |
| 600.3100 | 5 | S | 4 | 479.2864 |
| 713.3941 | 6 | I | 3 | 392.2544 |
| 860.4525 | 7 | F | 2 | 279.1703 |
| | 8 | L | 1 | 132.1019 |



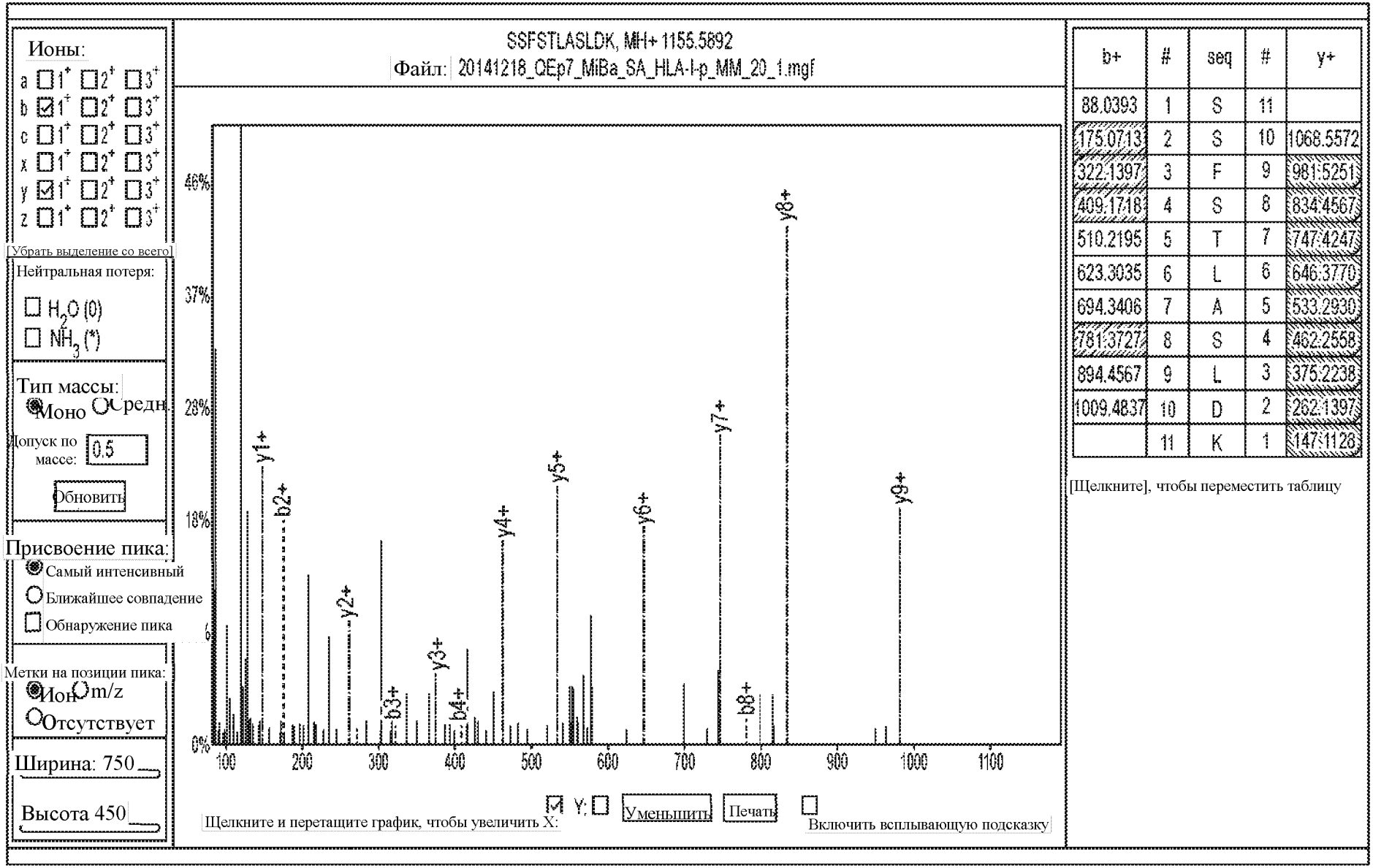
ФИГ. 25




| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 157.1084 | 1 | R | 10 | |
| 256.1768 | 2 | V | 9 | 1038.5982 |
| 327.2139 | 3 | A | 8 | 939.5298 |
| 442.2409 | 4 | D | 7 | 868.4927 |
| 555.3249 | 5 | I | 6 | 753.4658 |
| 652.3777 | 6 | P | 5 | 640.3817 |
| 765.4617 | 7 | I | 4 | 543.3289 |
| 893.5567 | 8 | K | 3 | 430.2449 |
| 990.6095 | 9 | P | 2 | 302.1499 |
| | 10 | W | 1 | 205.0972 |



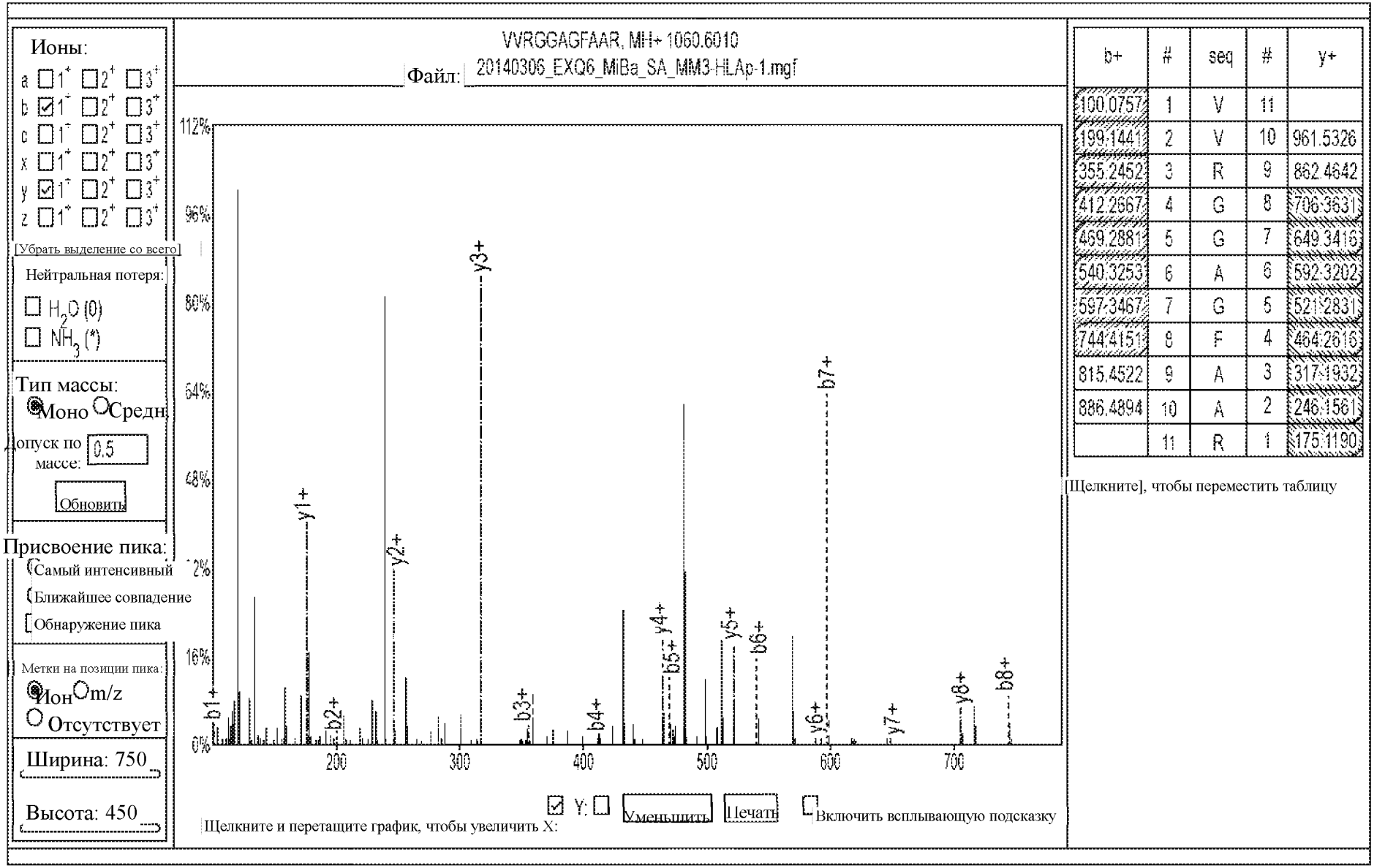
ФИГ. 26




| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 88.0393 | 1 | S | 11 | |
| 175.0713 | 2 | S | 10 | 1068.5572 |
| 322.1397 | 3 | F | 9 | 981.5251 |
| 409.1718 | 4 | S | 8 | 834.4567 |
| 510.2195 | 5 | T | 7 | 747.4247 |
| 623.3035 | 6 | L | 6 | 646.3770 |
| 694.3406 | 7 | A | 5 | 533.2930 |
| 781.3727 | 8 | S | 4 | 462.2558 |
| 894.4567 | 9 | L | 3 | 375.2238 |
| 1009.4837 | 10 | D | 2 | 262.1397 |
| | 11 | K | 1 | 147.1128 |



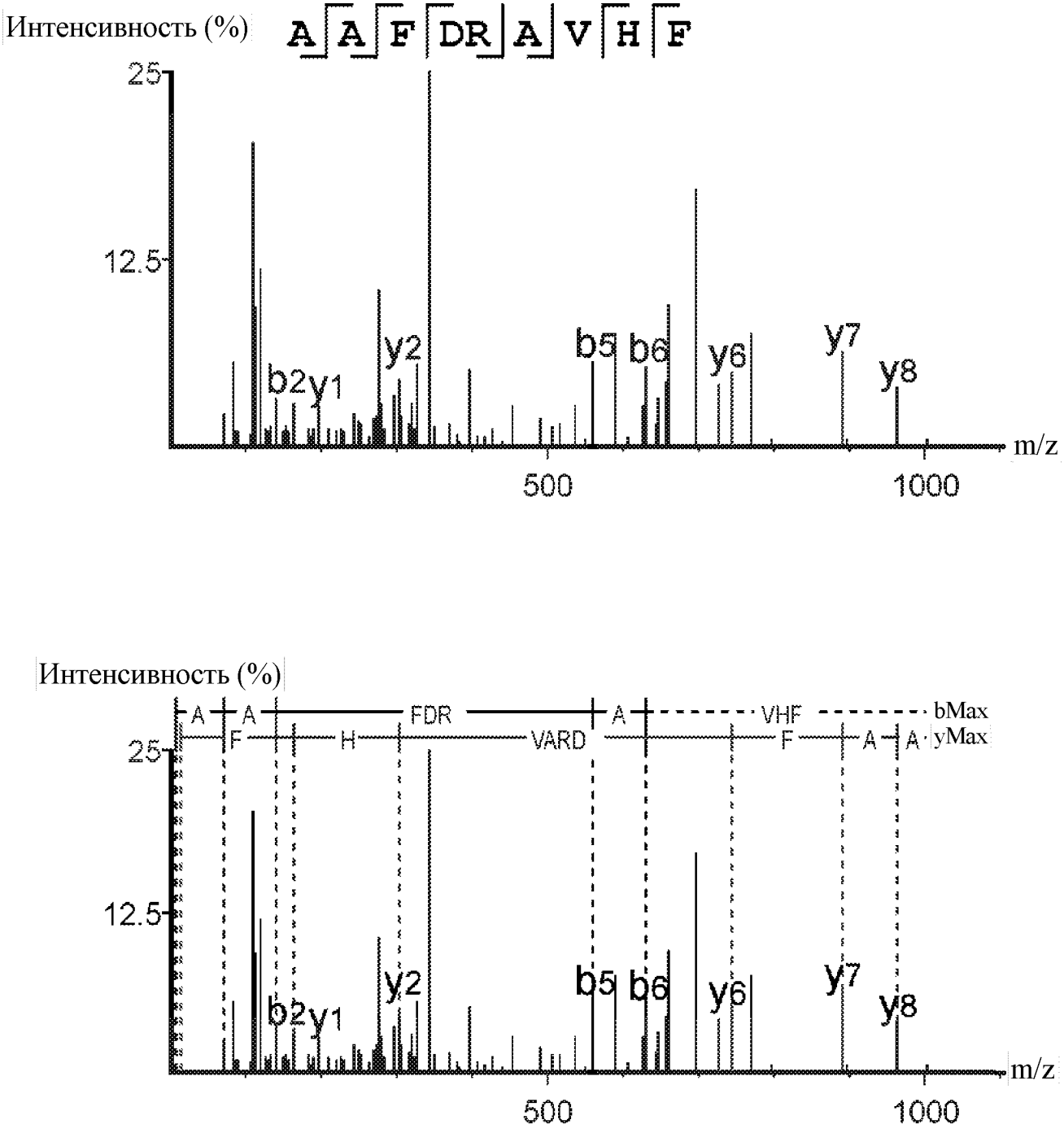
ФИГ. 27



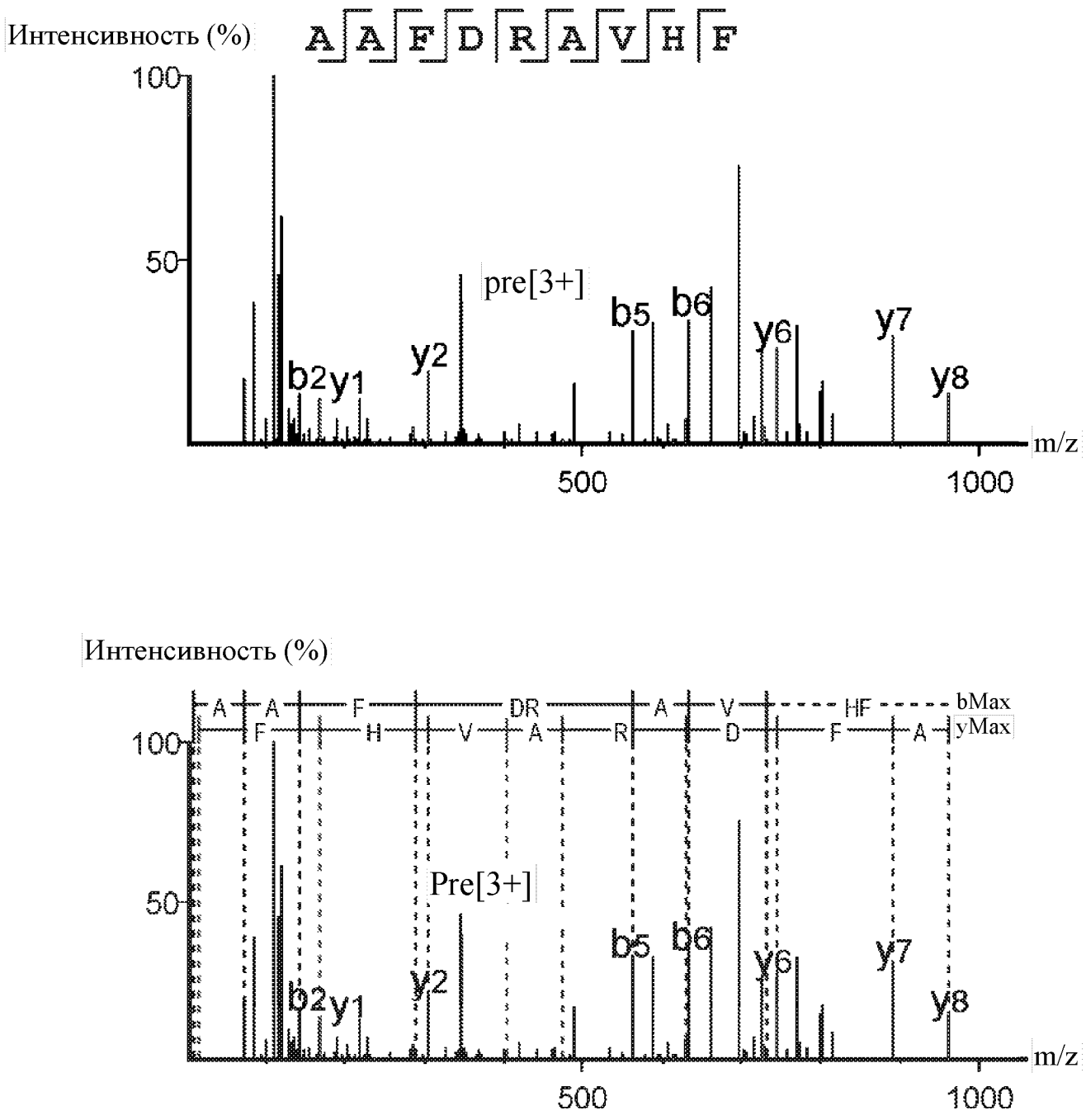

| b+ | # | seq | # | y+ |
|---|---|---|---|---|
| 100.0757 | 1 | V | 11 | |
| 199.1441 | 2 | V | 10 | 961.5326 |
| 355.2452 | 3 | R | 9 | 862.4642 |
| 412.2667 | 4 | G | 8 | 706.3631 |
| 469.2881 | 5 | G | 7 | 649.3416 |
| 540.3253 | 6 | A | 6 | 592.3202 |
| 597.3467 | 7 | G | 5 | 521.2831 |
| 744.4151 | 8 | F | 4 | 464.2616 |
| 815.4522 | 9 | A | 3 | 317.1932 |
| 886.4894 | 10 | A | 2 | 246.1561 |
| | 11 | R | 1 | 175.1190 |



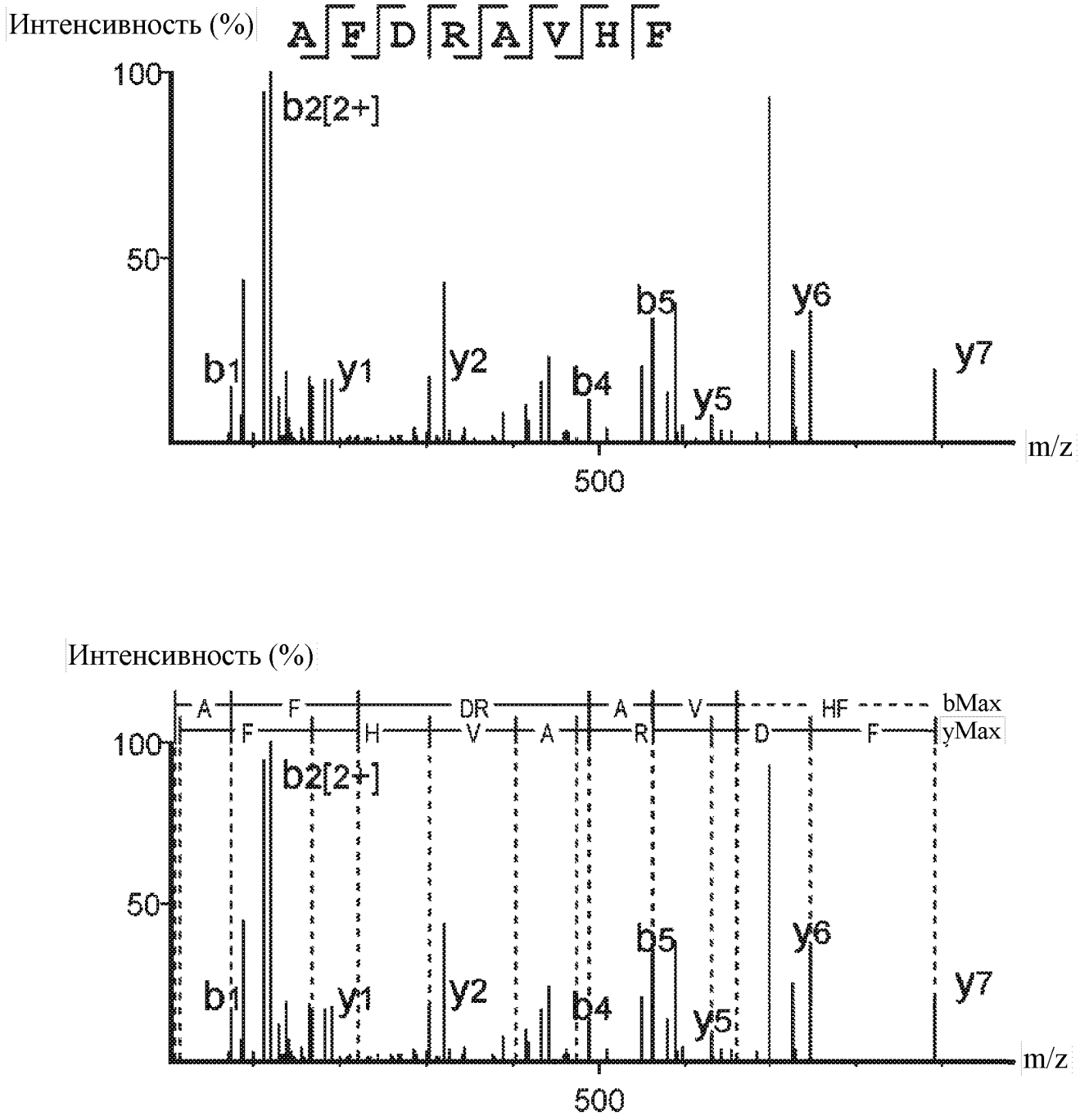
ФИГ. 28


Интенсивность (%)
A A F DR A V H F
25
12.5
b2
y1
y2
b5
b6
y6
y7
y8
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
A A FDR A VHF bMax
F H VARD F A A yMax
25
12.5
b2
y1
y2
b5
b6
y6
y7
y8
m/z
500
1000

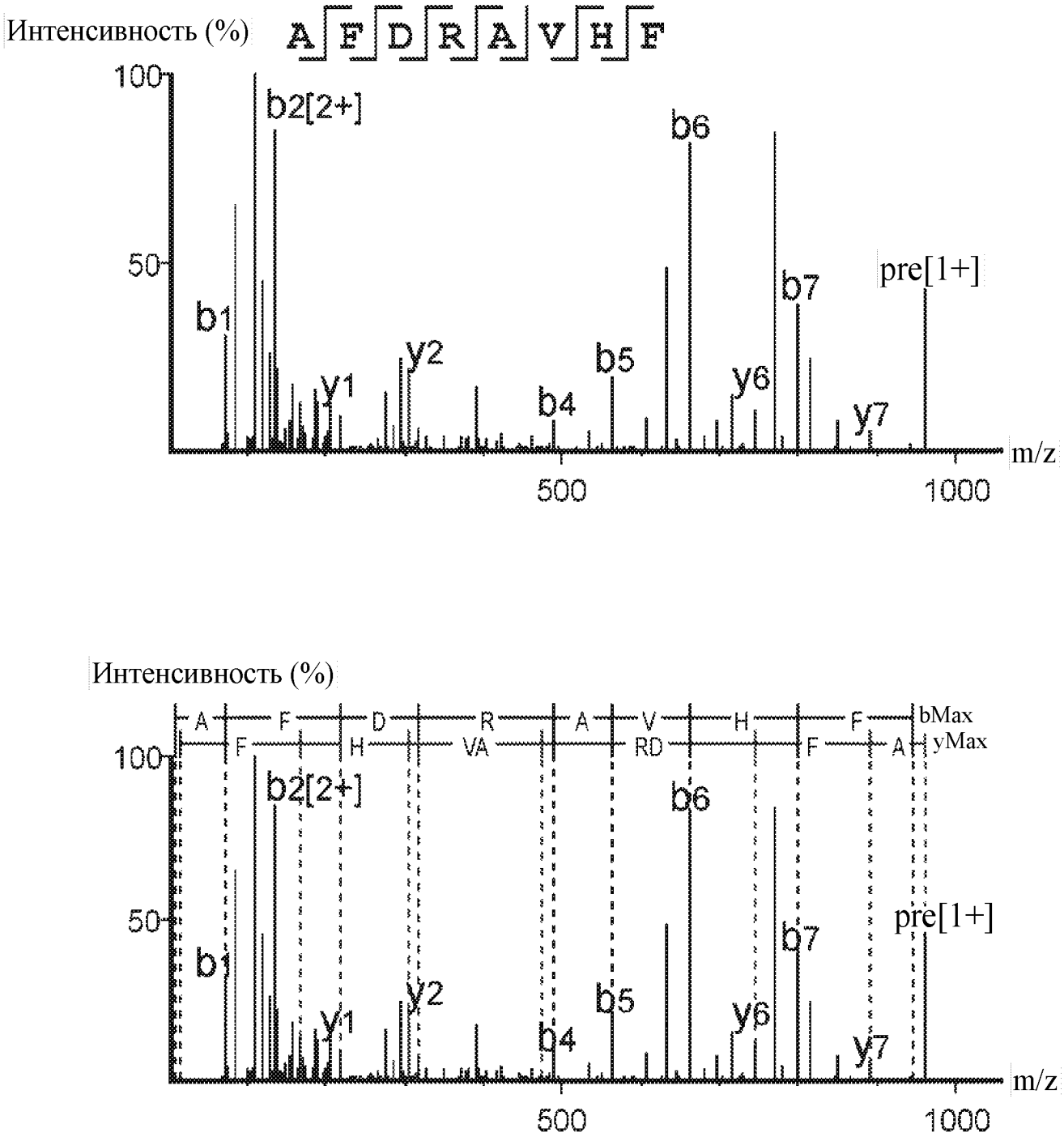
ФИГ. 29


Интенсивность (%)
A A F D R A V H F
100
50
pre[3+]
b5
b6
y6
y7
b2
y1
y2
y8
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
A A F DR A V HF bMax
F H V A R D F A yMax
100
50
Pre[3+]
b5
b6
y6
y7
b2
y1
y2
y8
m/z
500
1000

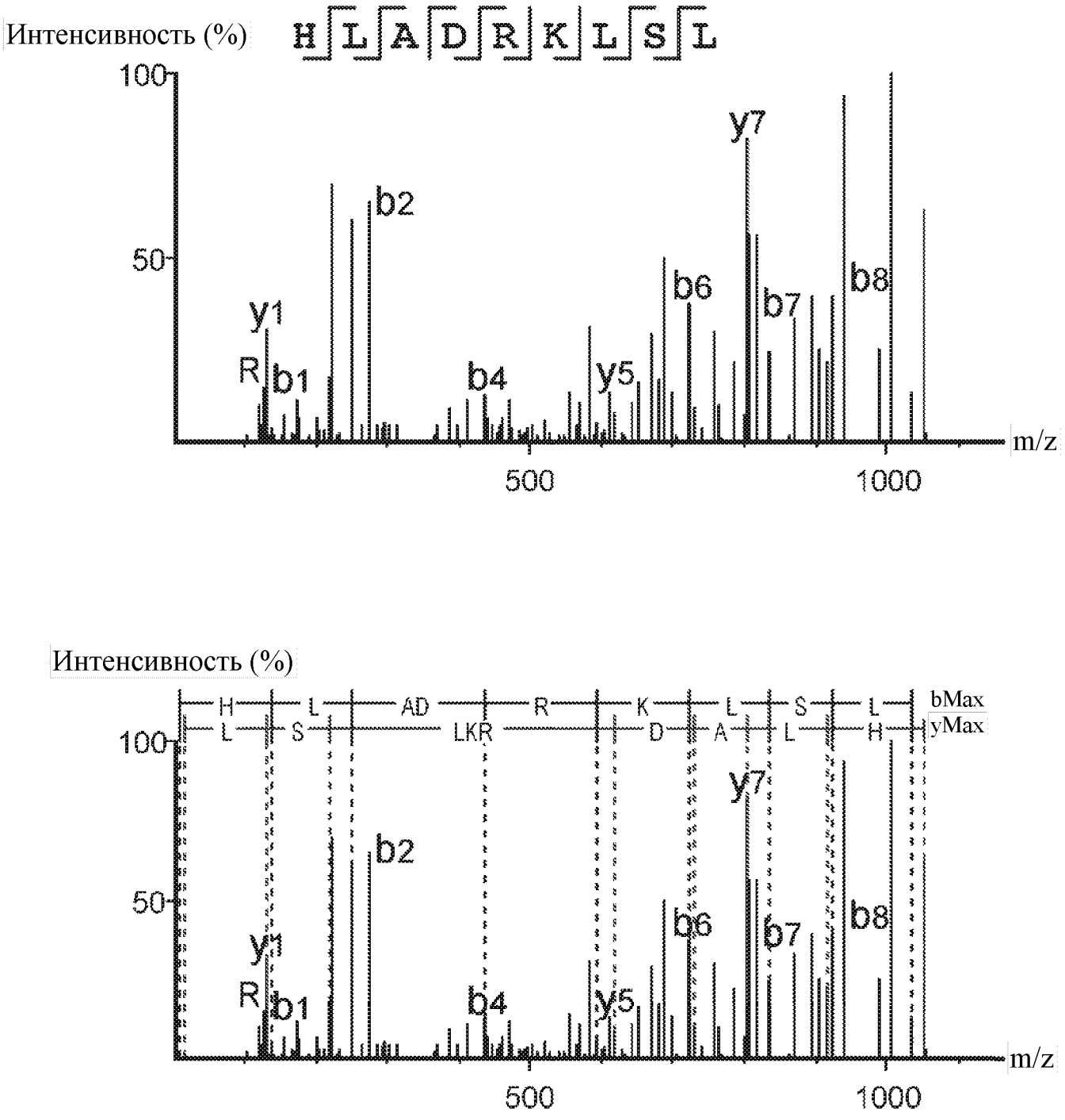
ФИГ. 30


Интенсивность (%)
A F D R A V H F
100
50
b2[2+]
b1
y1
y2
b4
b5
y5
y6
y7
m/z
500
Интенсивность (%)
A F DR A V HF bMax
F H V A R D F yMax
100
50
b2[2+]
b1
y1
y2
b4
b5
y5
y6
y7
m/z
500

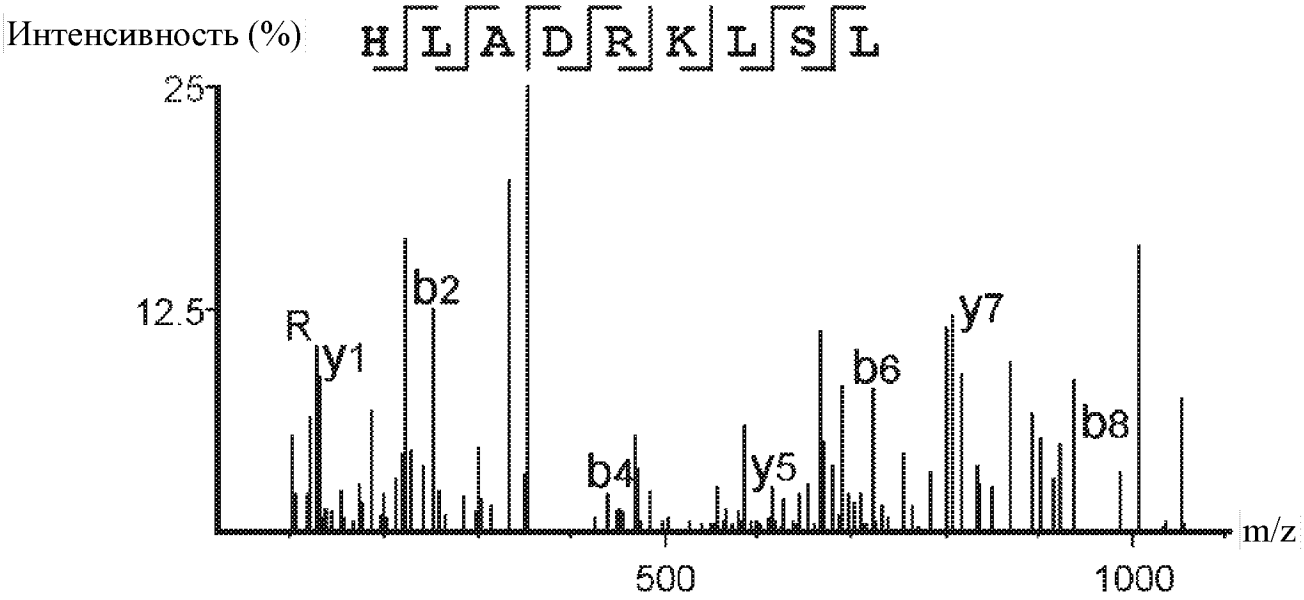
ФИГ. 31

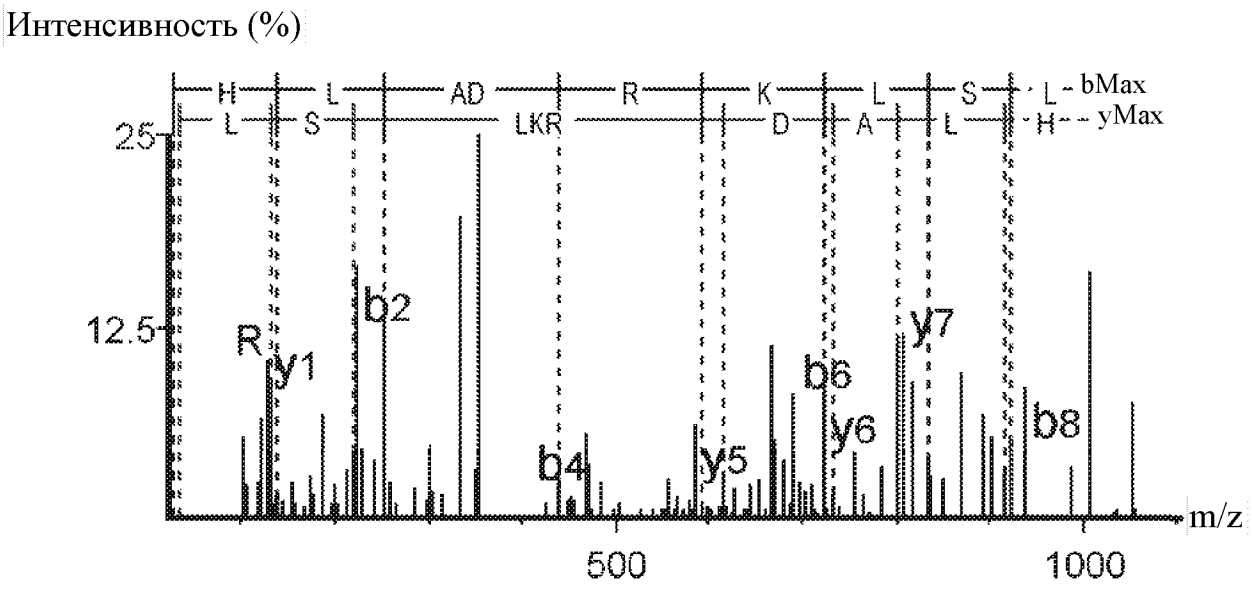

Интенсивность (%)
A F D R A V H F
100
50
b2[2+]
b6
pre[1+]
b7
b1
y2
b5
y1
y6
b4
y7
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
A F D R A V H F
F H VA RD F A
bMax
yMax
100
50
b2[2+]
b6
pre[1+]
b7
b1
y2
b5
y1
y6
b4
y7
m/z
500
1000

ФИГ. 32

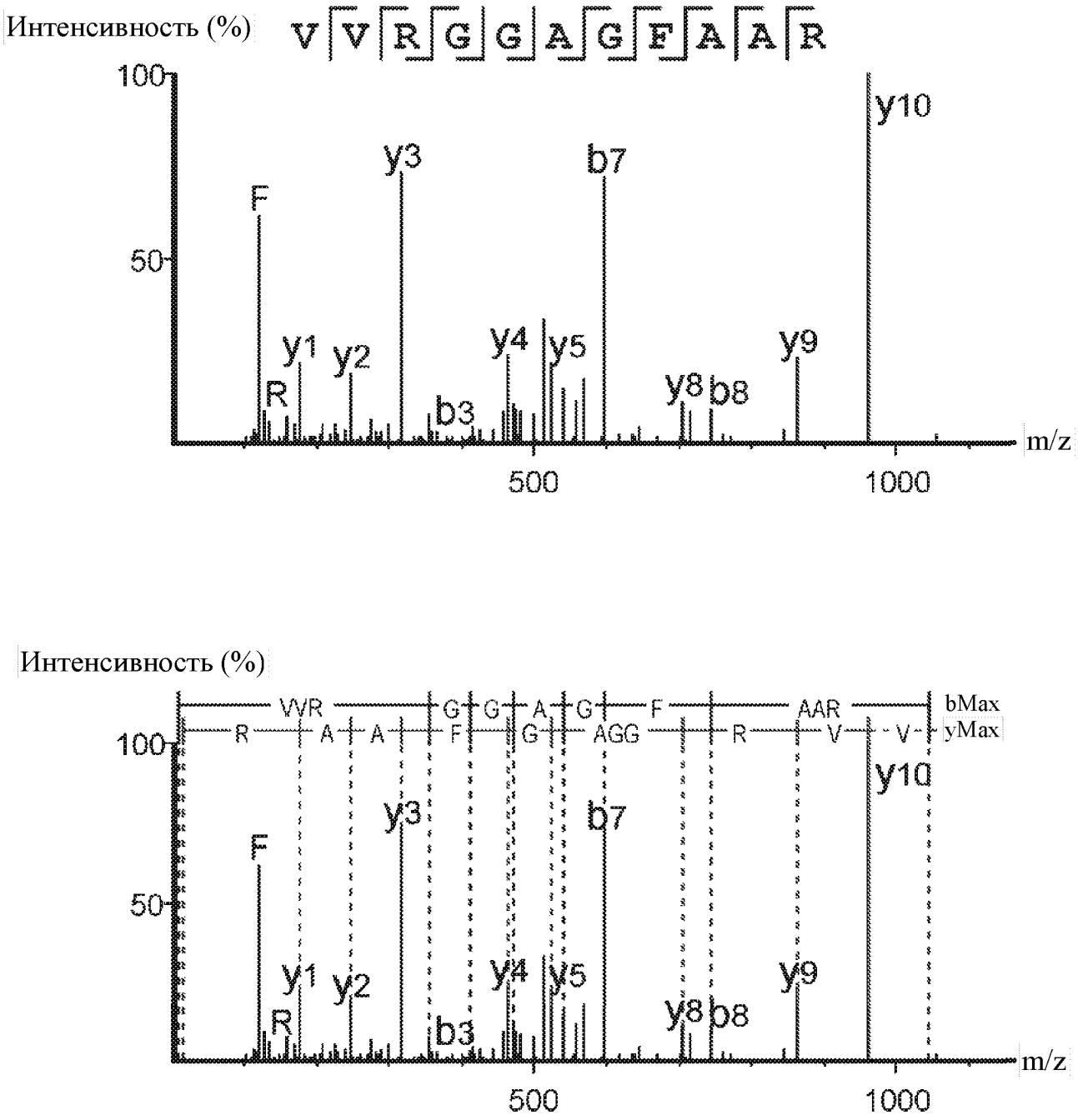

Интенсивность (%)
H L A D R K L S L
100
50
y7
b2
b6
b7
b8
y1
R
b1
b4
y5
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
H L AD R K L S L
L S LKR D A L H
bMax
yMax
100
50
y7
b2
b6
b7
b8
y1
R
b1
b4
y5
m/z
500
1000

ФИГ. 33

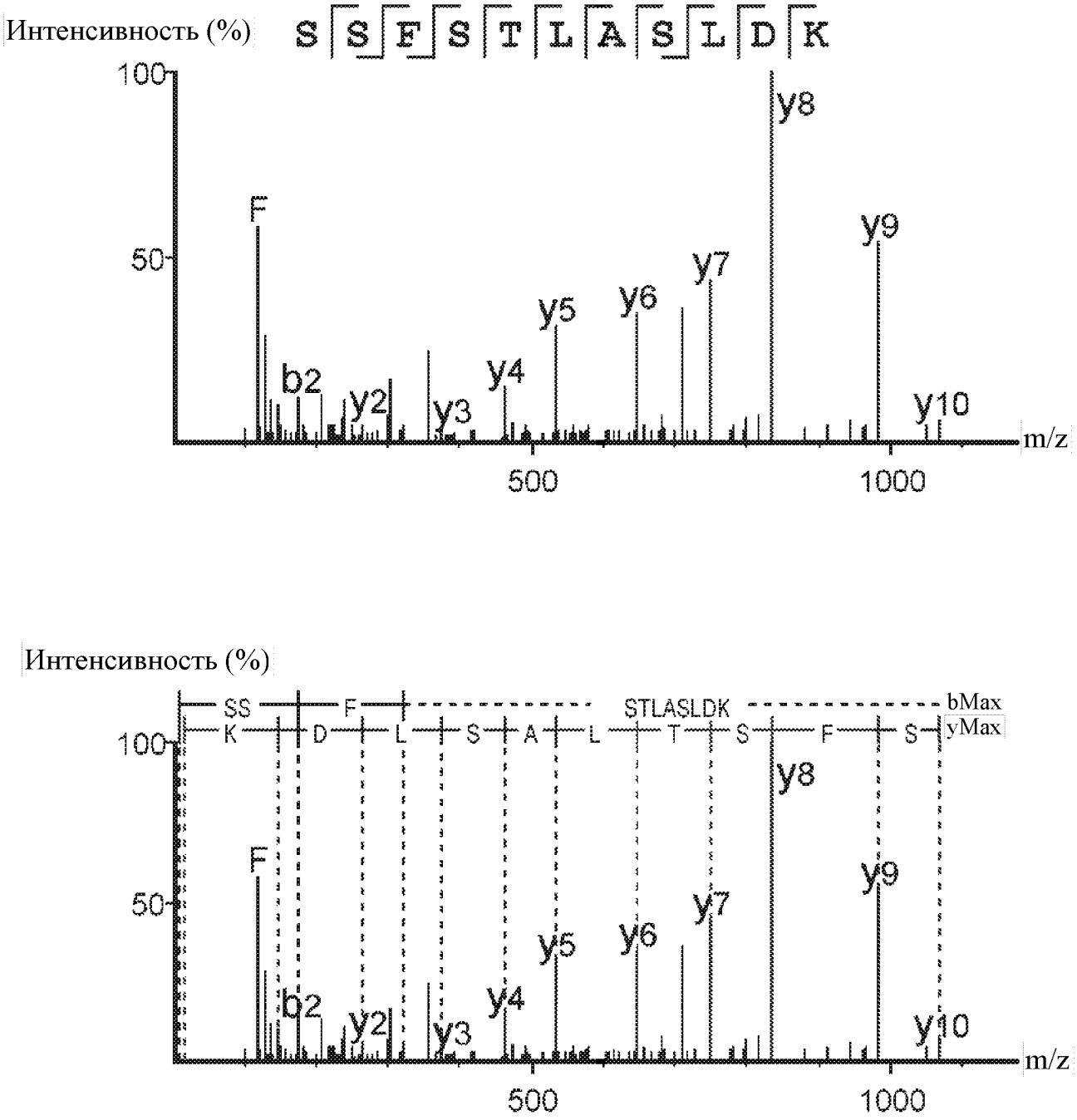

Интенсивность (%)
H L A D R K L S L
25
12.5
R
y1
b2
b4
y5
b6
y7
b8
m/z
500
1000


Интенсивность (%)
H L AD R K L S L
L S LKR D A L H
bMax
yMax
25
12.5
R
y1
b2
b4
y5
b6
y6
y7
b8
m/z
500
1000

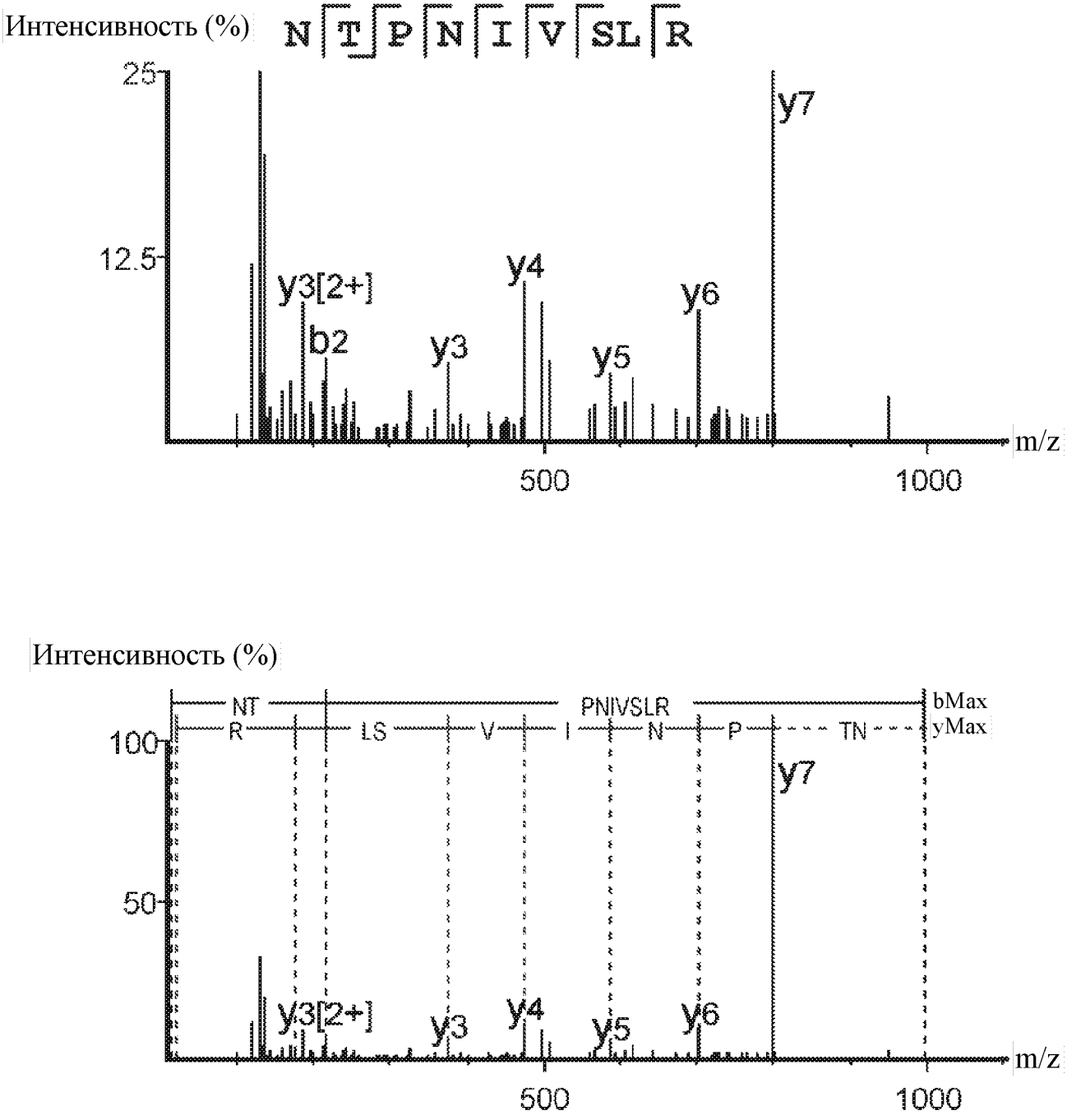
ФИГ. 34


Интенсивность (%)
V V R G G A G F A A R
100
50
y10
y3
b7
F
y1
y2
y4
y5
y9
R
b3
y8
b8
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
VVR
G G A G F
AAR
bMax
R A A F G AGG R V V
yMax
100
50
y10
y3
b7
F
y1
y2
y4
y5
y9
R
b3
y8
b8
m/z
500
1000

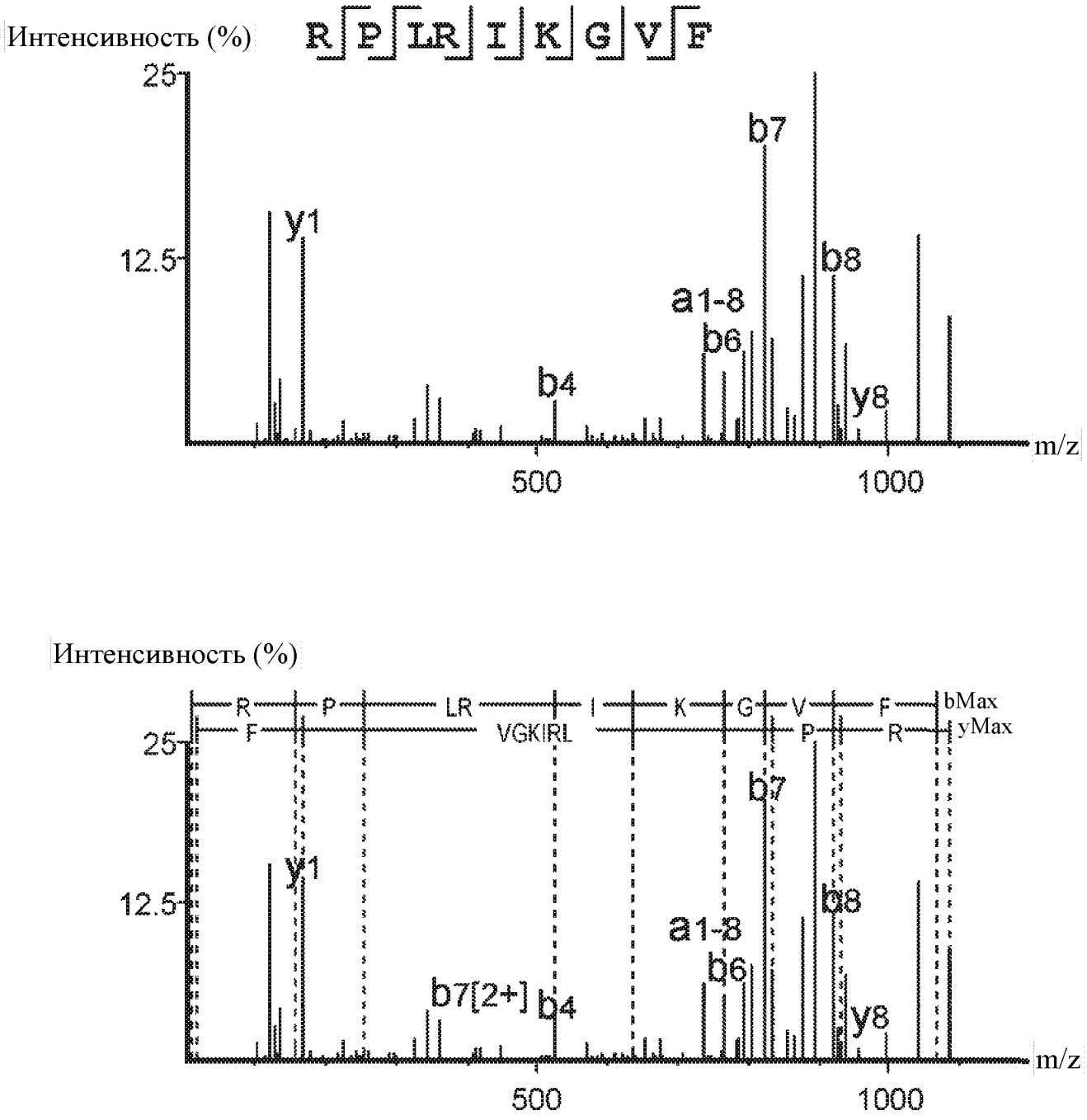
ФИГ. 35


Интенсивность (%)
S S F S T L A S L D K
100
50
F
b2
y2
y3
y4
y5
y6
y7
y8
y9
y10
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
SS
F
STLASLDK
bMax
K
D
L
S
A
L
T
S
F
S
yMax
100
50
F
b2
y2
y3
y4
y5
y6
y7
y8
y9
y10
m/z
500
1000

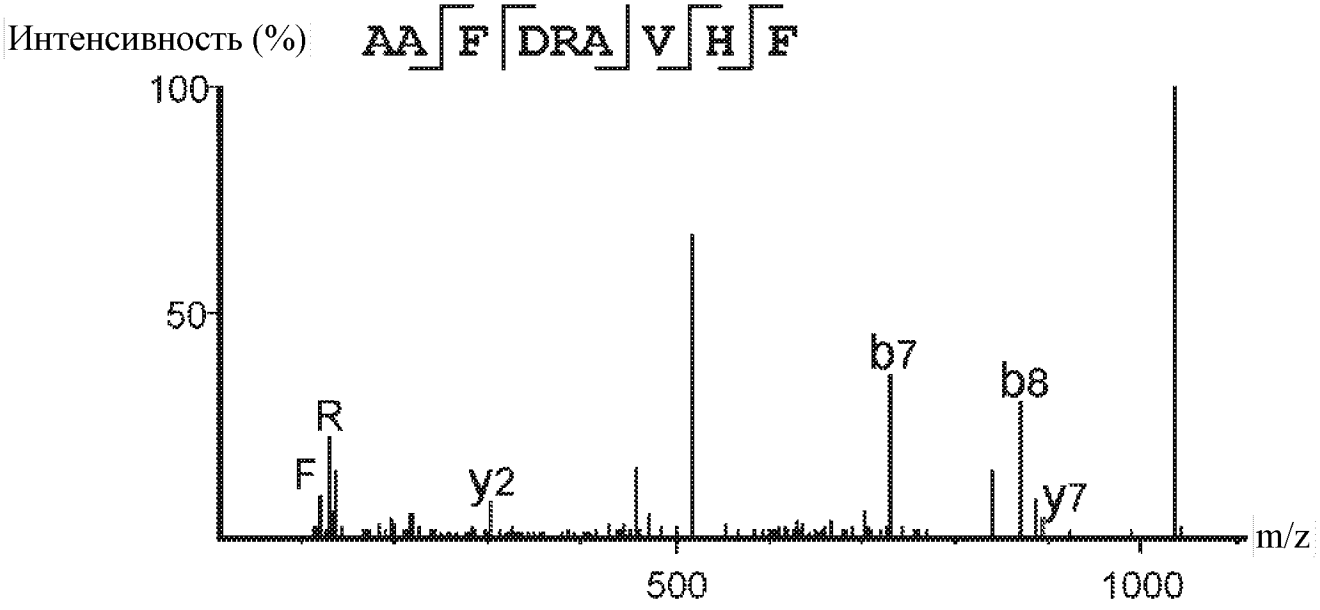
ФИГ. 36

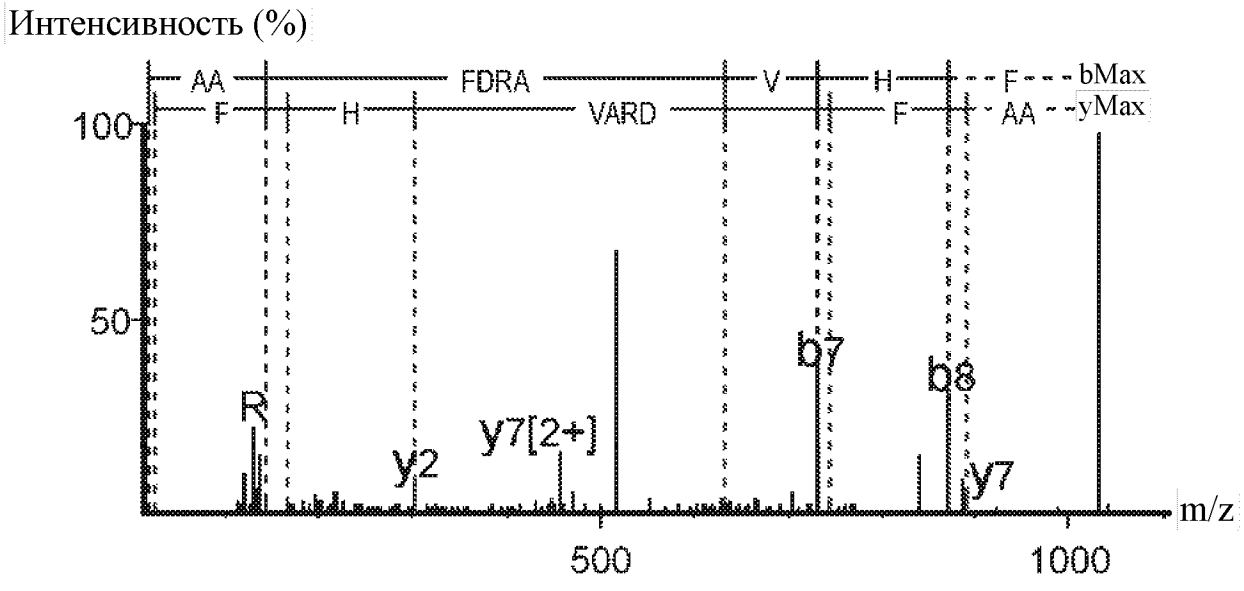

Интенсивность (%)
N T P N I V SL R
25
12.5
y7
y4
y3[2+]
y6
b2
y3
y5
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
NT
R
LS
V
I
PNIVSLR
N
P
TN
bMax
yMax
100
50
y7
y3[2+]
y3
y4
y5
y6
m/z
500
1000

ФИГ. 37

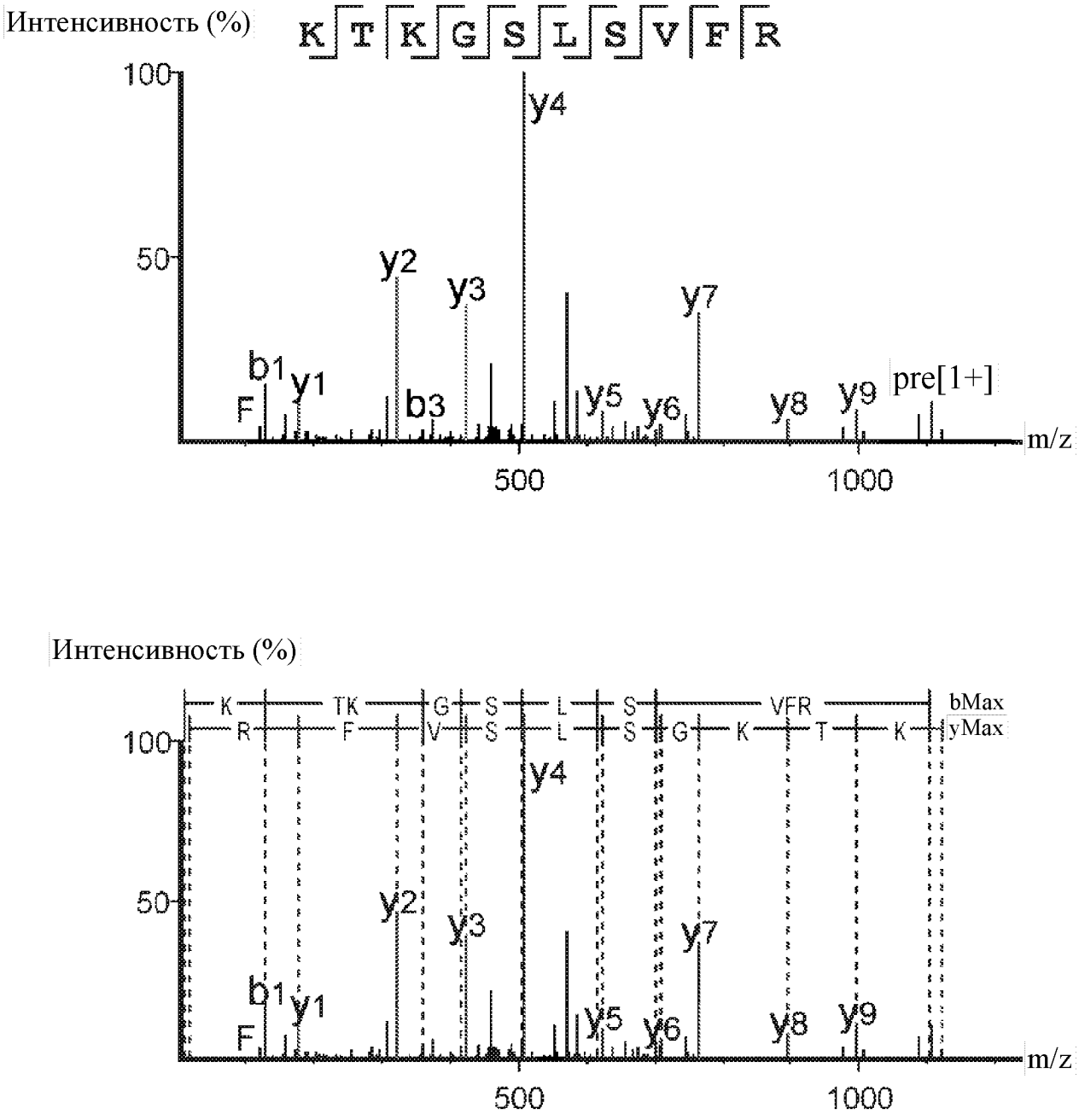

Интенсивность (%)
R P LR I K G V F
25
12.5
y1
b7
b8
a1-8
b6
b4
y8
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
R P LR I K G V F bMax
F VGKIRL P R yMax
25
12.5
y1
b7
b8
a1-8
b6
b7[2+]
b4
y8
m/z
500
1000

ФИГ. 38

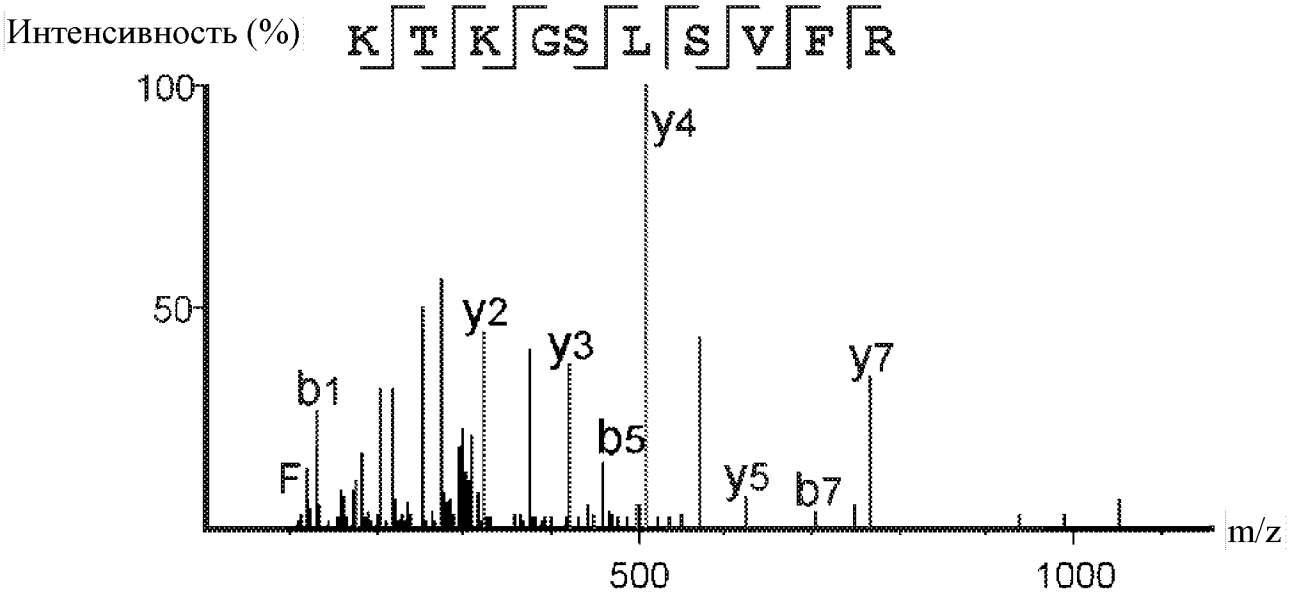

Интенсивность (%)
AA F DRA V H F
100
50
R
F
y2
b7
b8
y7
500
1000
m/z

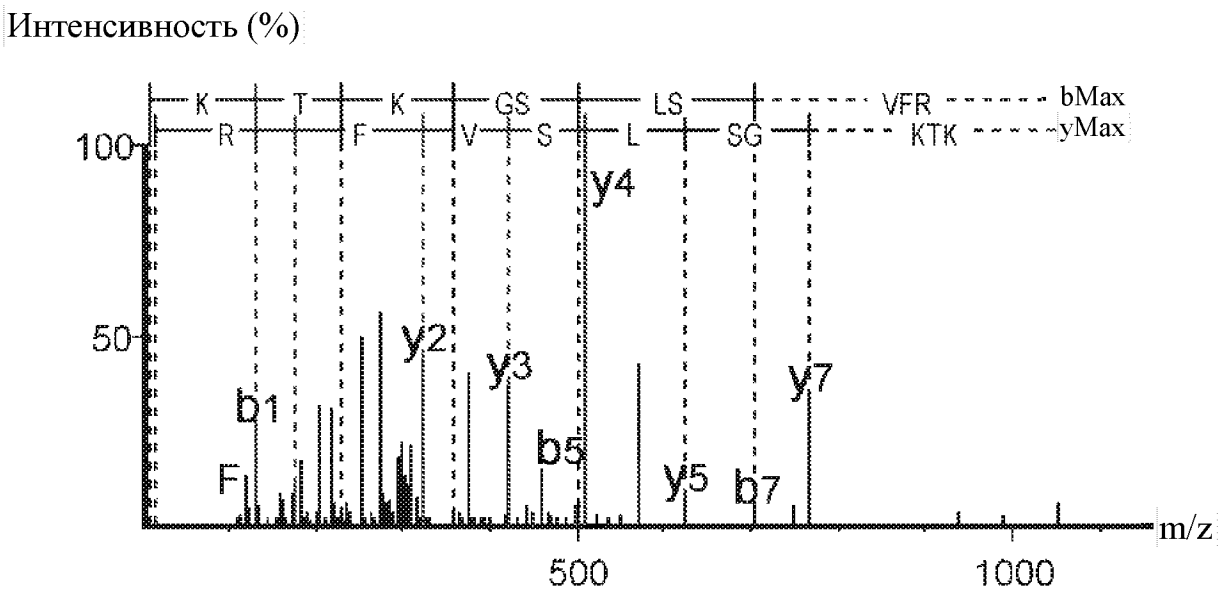

Интенсивность (%)
AA
FDRA
V
H
F
bMax
F
H
VARD
F
AA
yMax
100
50
R
y2
y7[2+]
b7
b8
y7
500
1000
m/z

ФИГ. 39

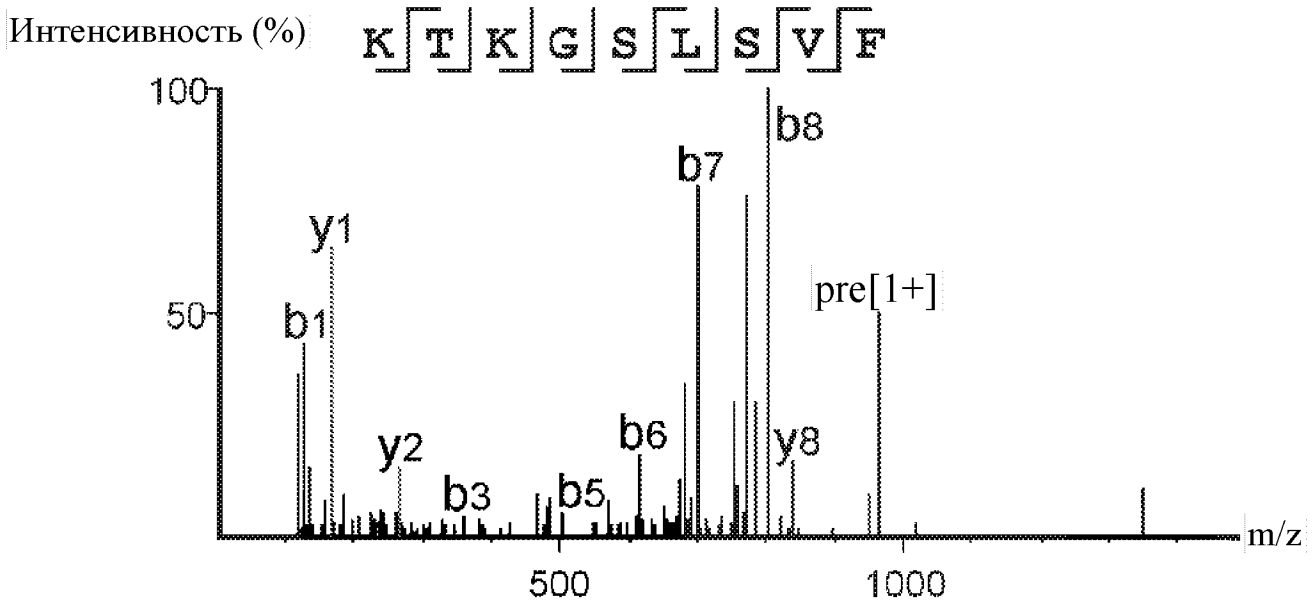

Интенсивность (%)
K T K G S L S V F R
100
50
y4
y2
y3
y7
b1
y1
F
b3
y5
y6
y8
y9
pre[1+]
m/z
500
1000
Интенсивность (%)
K TK G S L S VFR
R F V S L S G K T K
bMax
yMax
100
50
y4
y2
y3
y7
b1
y1
F
y5
y6
y8
y9
m/z
500
1000

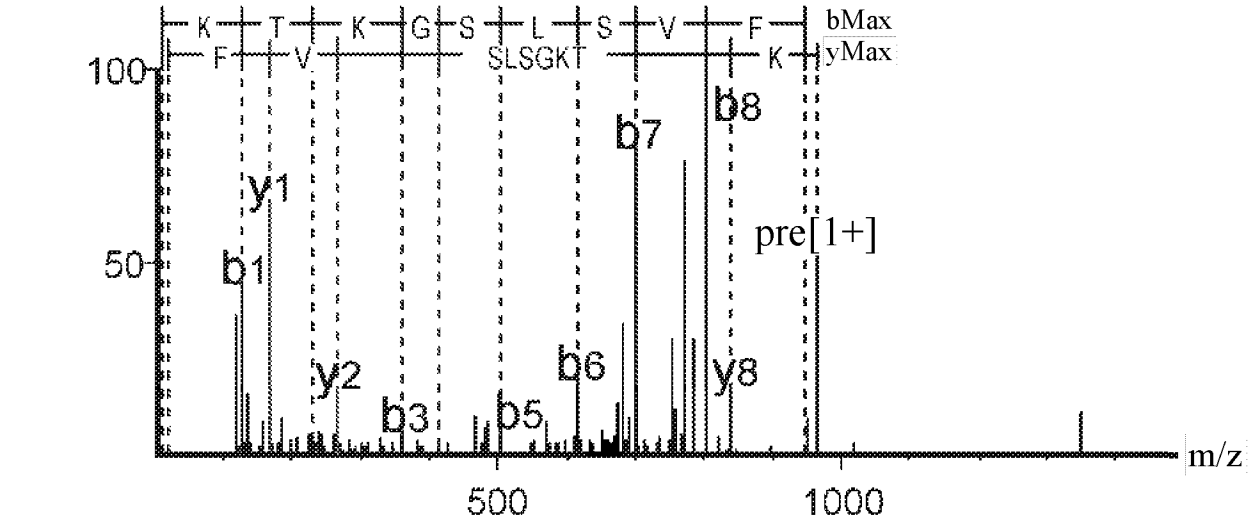
ФИГ. 40


Интенсивность (%)
K T K GS L S V F R
100
50
y4
y2
y3
y7
b1
b5
F
y5
b7
m/z
500
1000

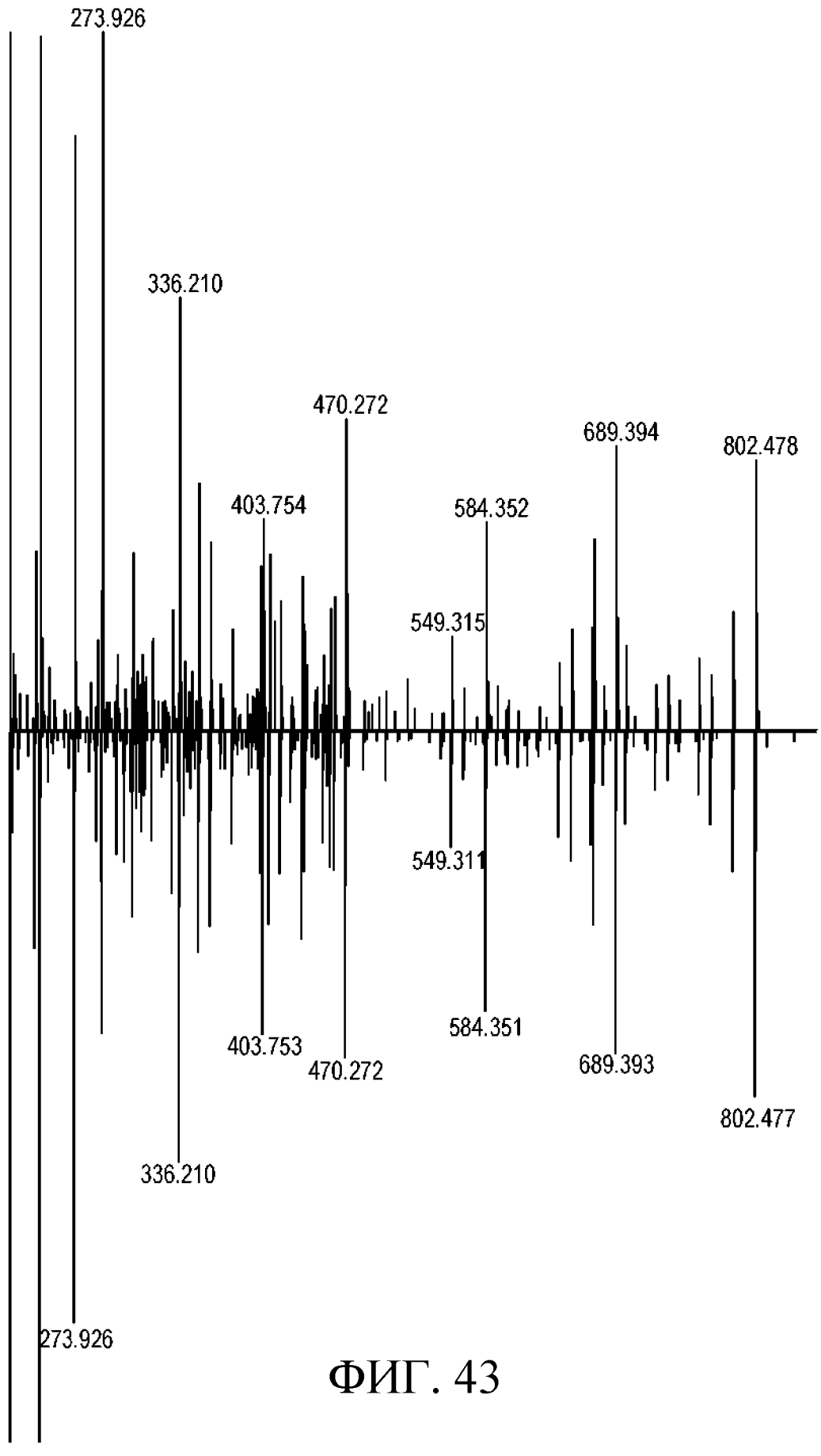

Интенсивность (%)
K T K GS LS VFR bMax
R F V S L SG KTK yMax
100
50
y4
y2
y3
y7
b1
b5
F
y5
b7
m/z
500
1000

ФИГ. 41

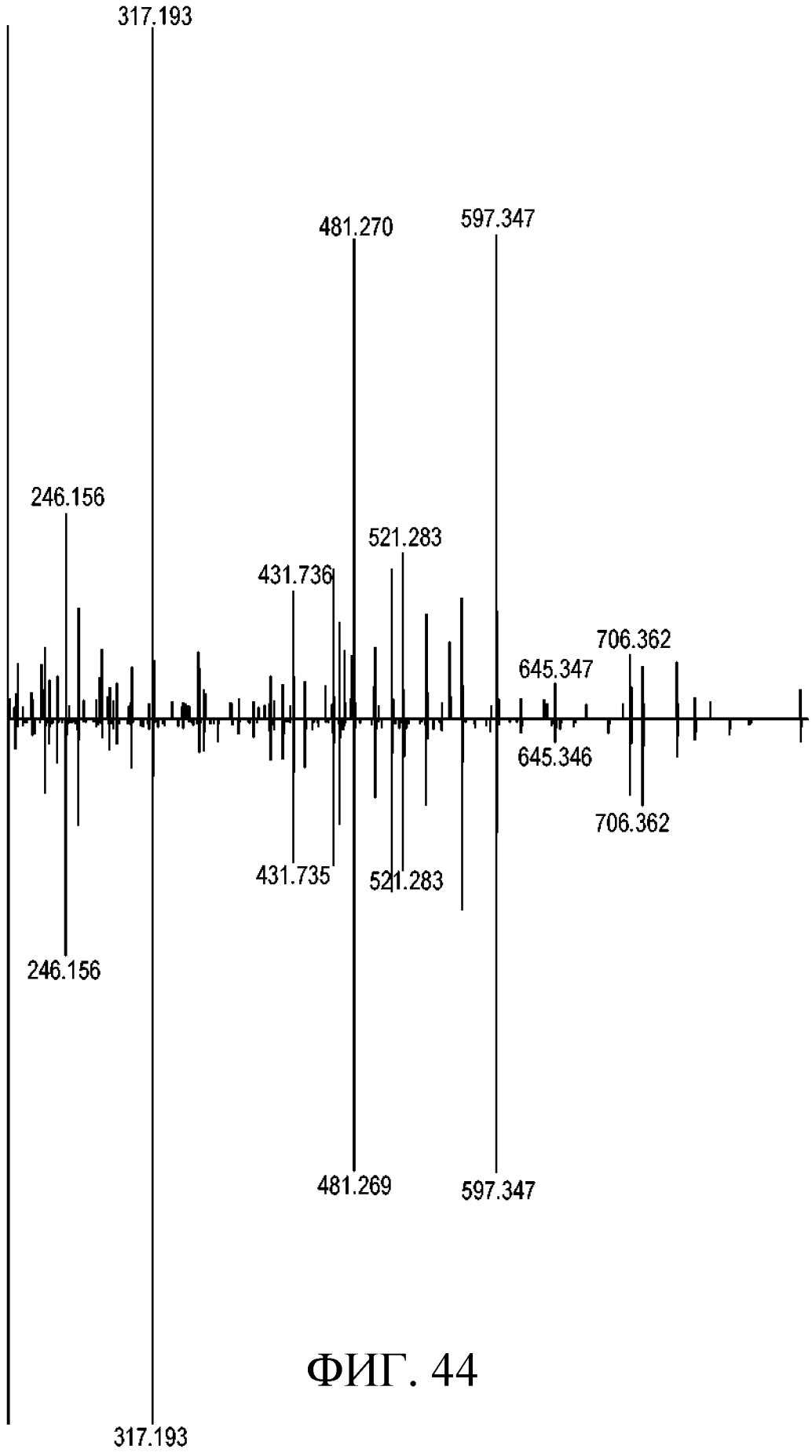

Интенсивность (%)
K T K G S L S V F
100
50
b8
b7
y1
pre[1+]
b1
y2
b6
y8
b3
b5
m/z
500
1000


Интенсивность (%)
K T K G S L S V F
bMax
F V SLSGKT K
yMax
100
50
b8
b7
y1
pre[1+]
b1
y2
b6
y8
b3
b5
m/z
500
1000

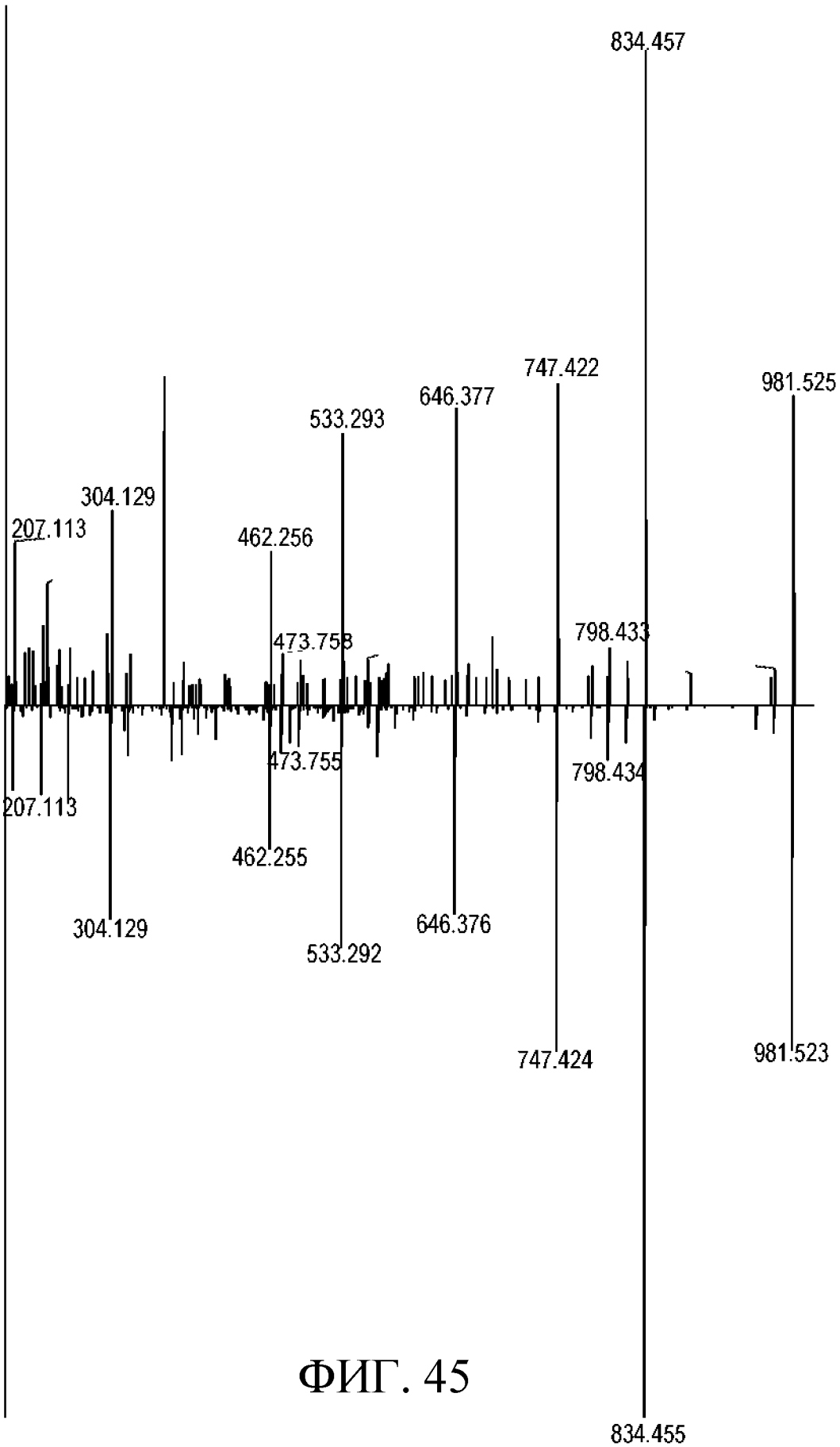
ФИГ. 42


273.926
336.210
470.272
689.394
802.478
403.754
584.352
549.315
549.311
584.351
403.753
470.272
689.393
802.477
336.210
273.926

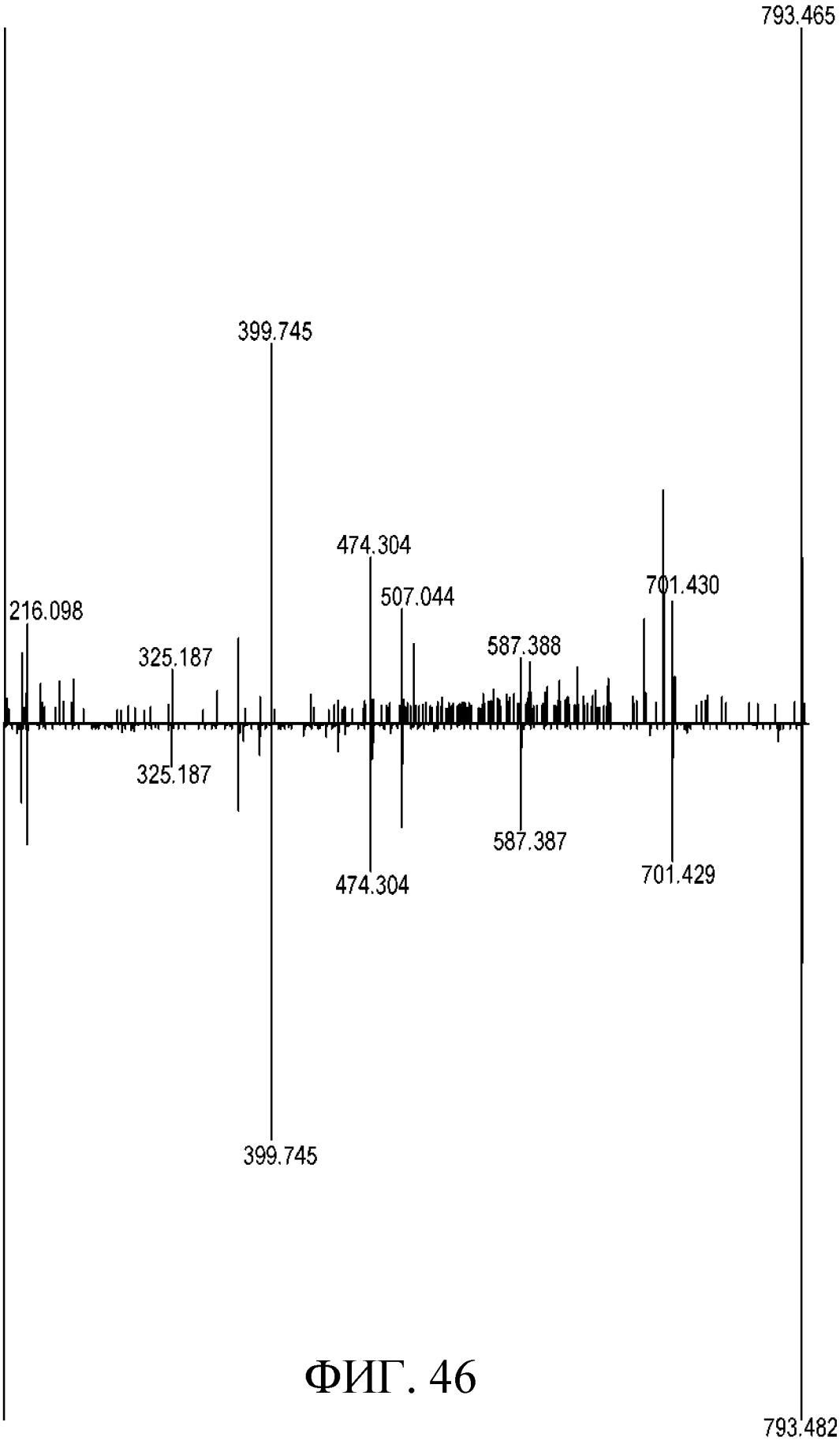
ФИГ. 43


317.193
481.270
597.347
246.156
521.283
431.736
706.362
645.347
645.346
706.362
431.735
521.283
246.156
481.269
597.347
317.193

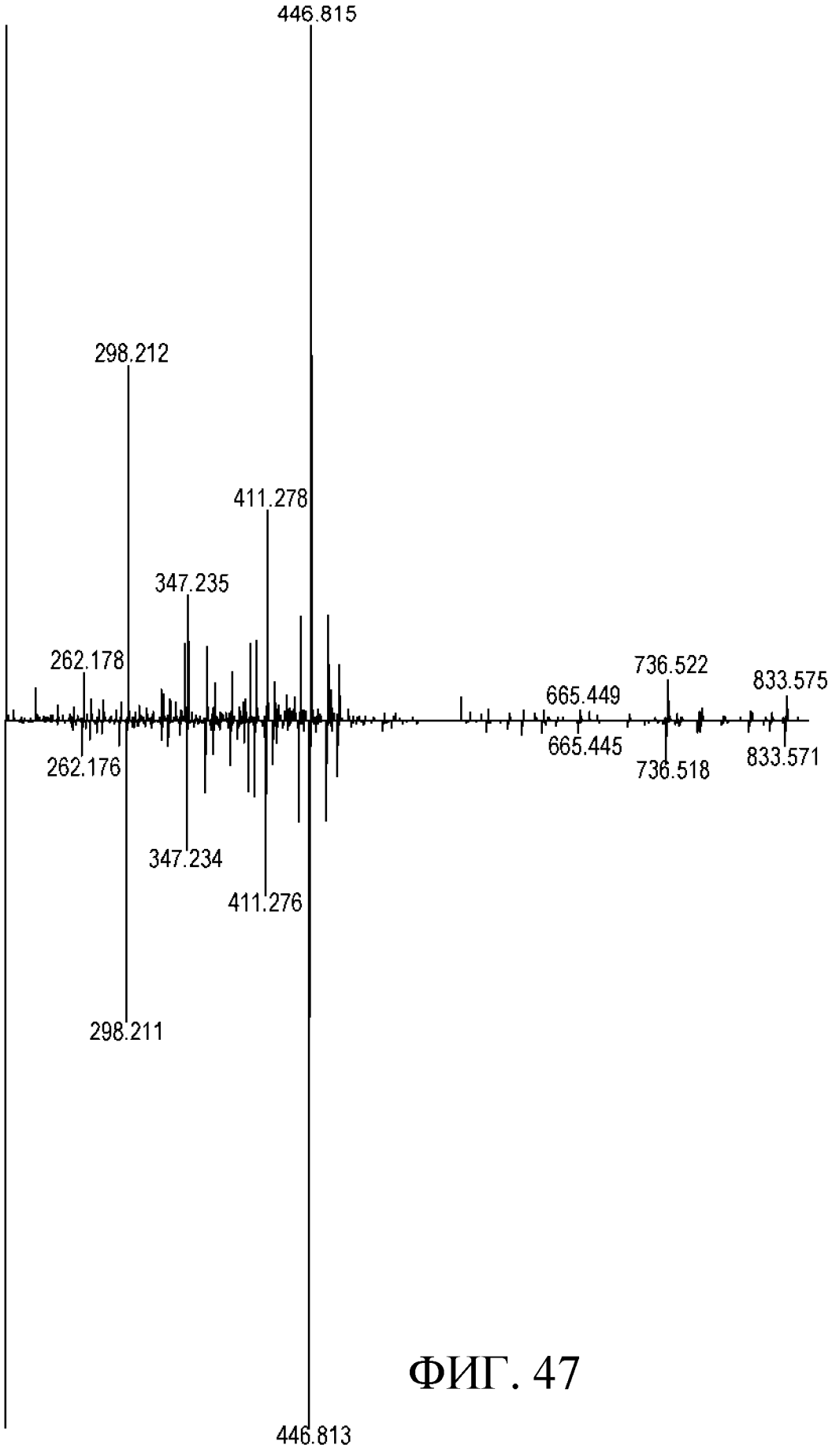
ФИГ. 44


834.457
747.422
981.525
646.377
533.293
304.129
207.113
462.256
473.758
798.433
473.755
798.434
207.113
462.255
304.129
646.376
533.292
747.424
981.523
834.455

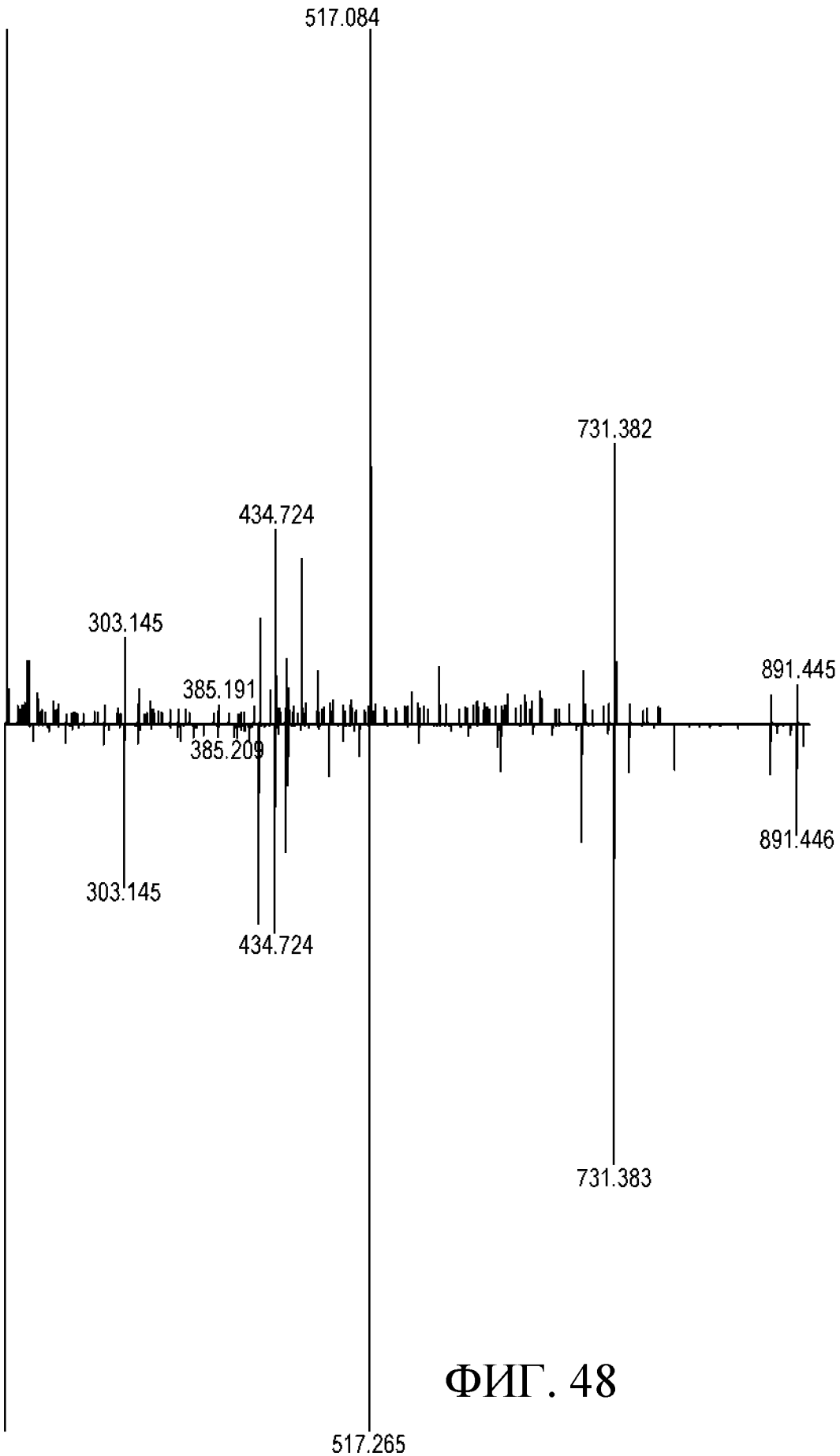
ФИГ. 45


793.465
399.745
474.304
507.044
701.430
216.098
325.187
587.388
325.187
587.387
474.304
701.429
399.745
793.482

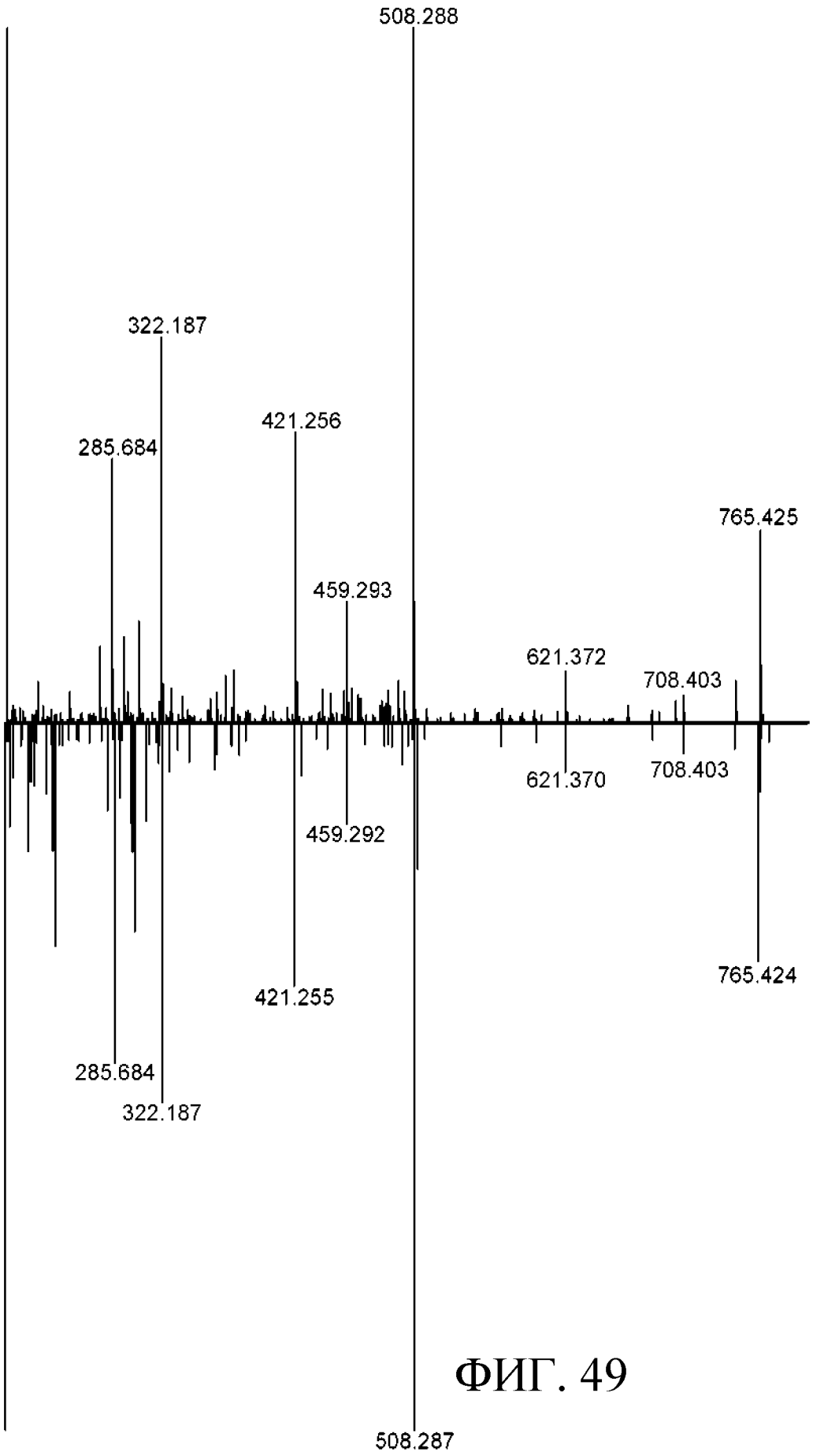
ФИГ. 46


446.815
298.212
411.278
347.235
262.178
736.522
833.575
665.449
665.445
262.176
736.518
833.571
347.234
411.276
298.211
446.813

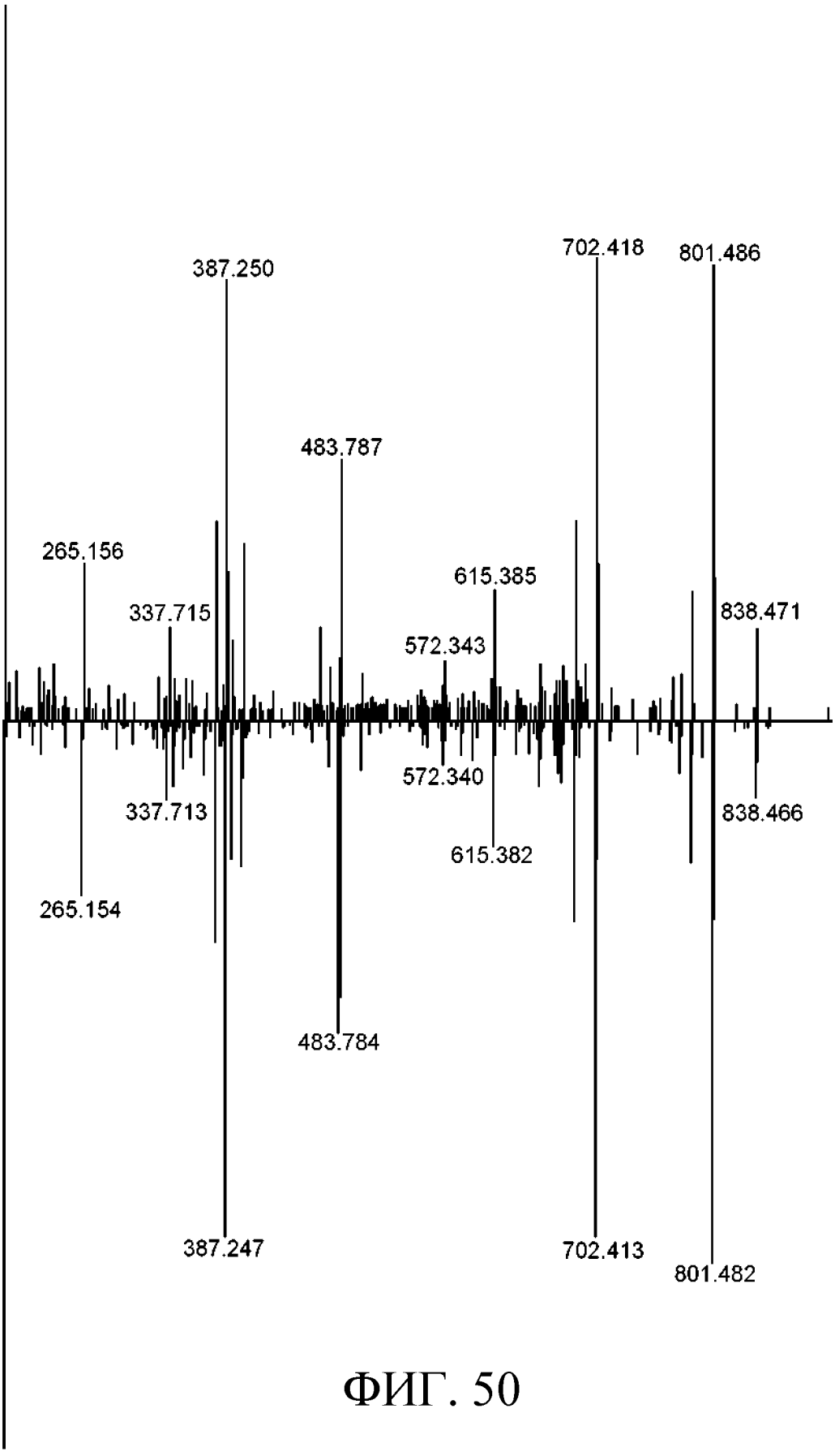
ФИГ. 47


517.084
731.382
434.724
303.145
385.191
385.209
891.445
891.446
303.145
434.724
731.383
517.265

ФИГ. 48

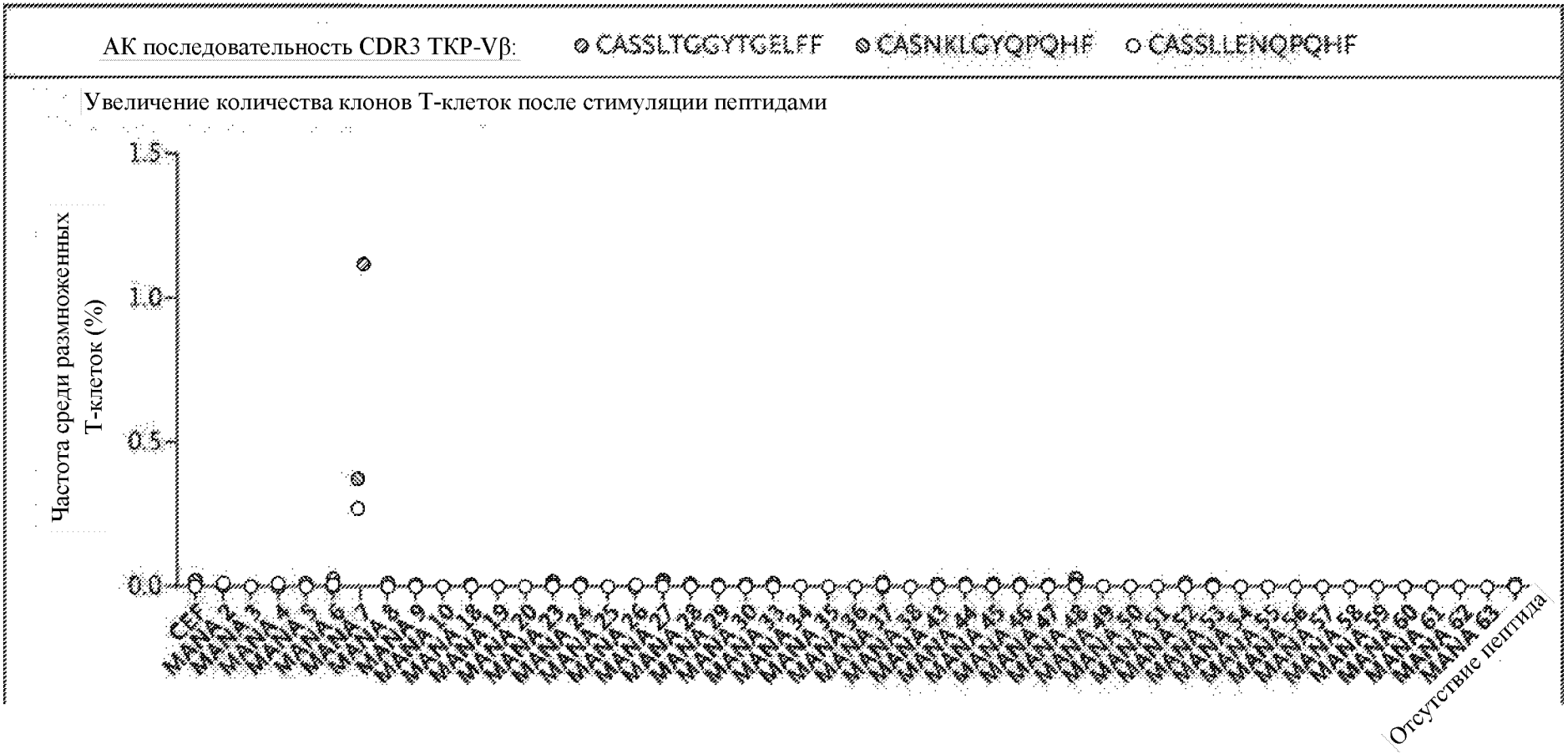

508.288
322.187
421.256
285.684
765.425
459.293
621.372
708.403
621.370
708.403
459.292
765.424
421.255
285.684
322.187
508.287

ФИГ. 49


387.250
702.418
801.486
483.787
265.156
615.385
337.715
838.471
572.343
572.340
337.713
838.466
615.382
265.154
483.784
387.247
702.413
801.482

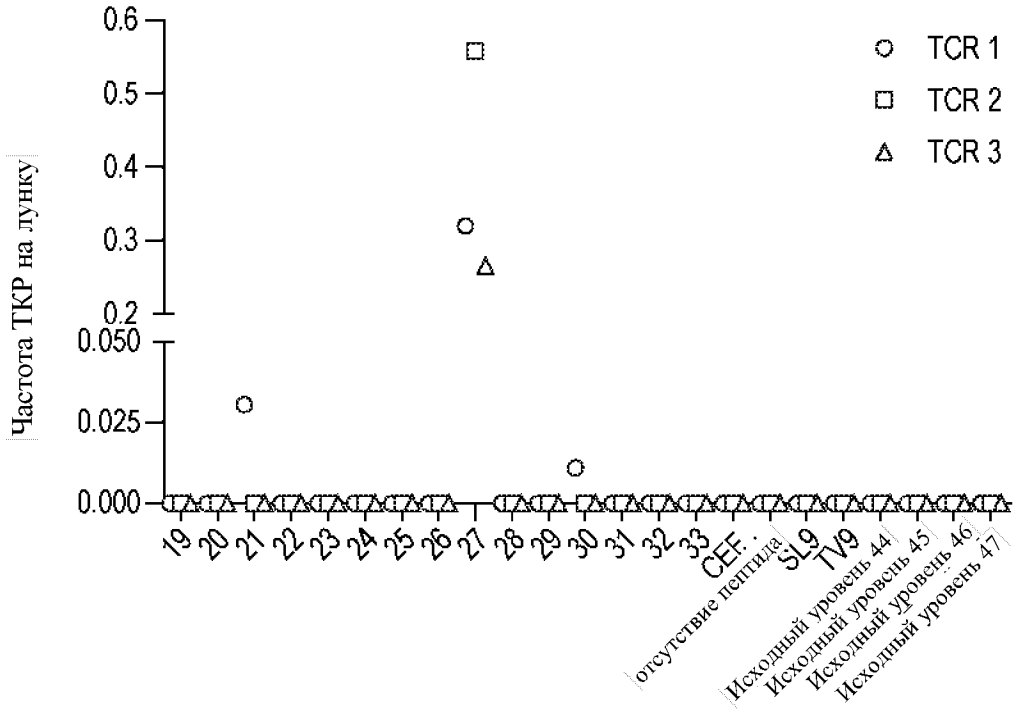
ФИГ. 50

Панель A:



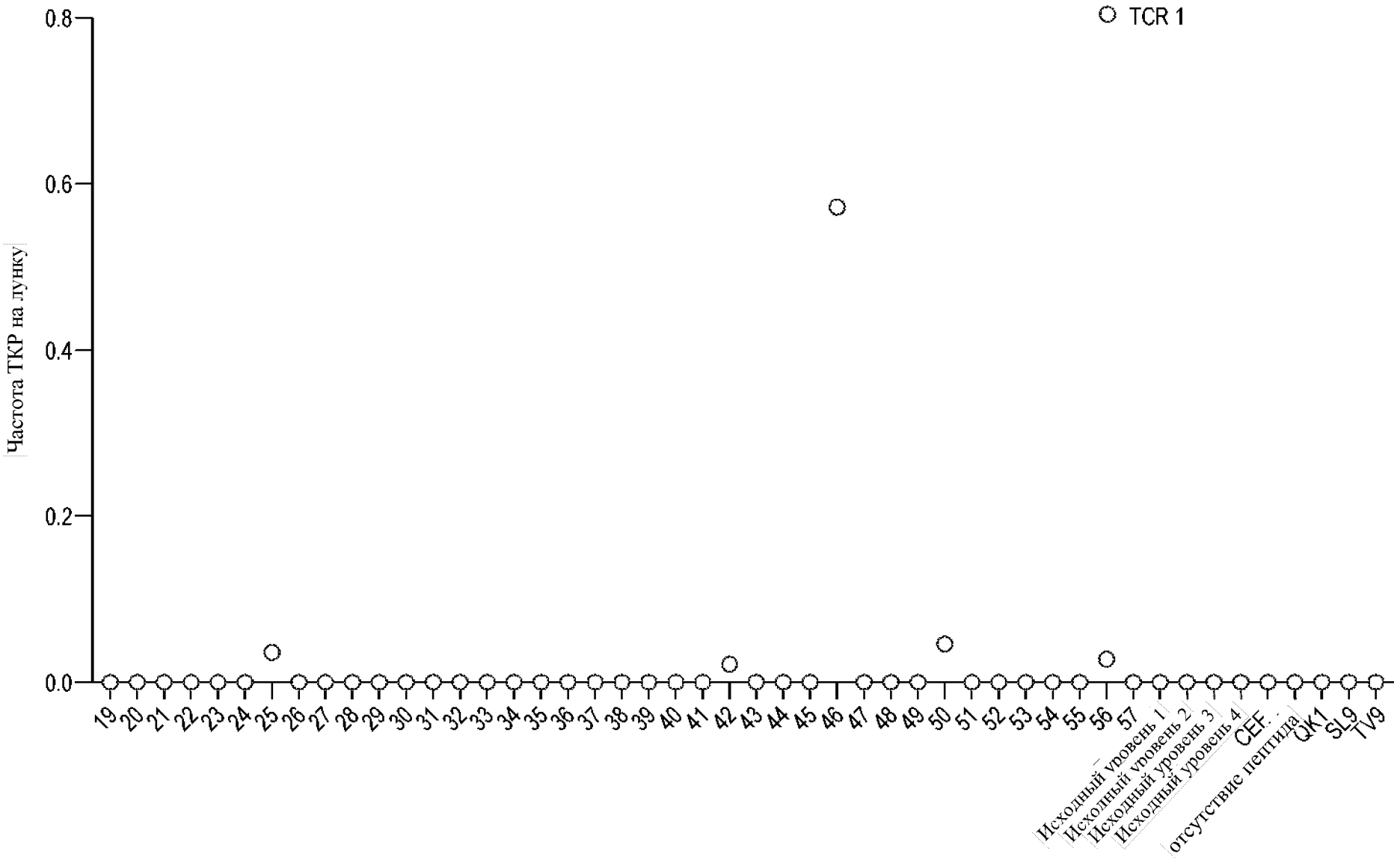

ФИГ. 51

Панель B:




ФИГ. 51 (продолж.)

Панель C:




ФИГ. 51 (продолж.)

Панель A: Последовательность CLT-антигена 1 (аннотированная с пептидами, обнаруженными с помощью масс-спектрометрии) над пептидами, обнаруженными HERVFEST

| | |
|---|---|
| CLT Ant 1 > | MWNFFRRELTSNGFPENFSLDVPANTYNALKSRLCDPNADHTSCPSPCSLHAAGALPGTGRQRWRVELA**HLADRKLSL**RDVSRLRQG |
| **Pat.188B** | **ANTYNALKSR (A*11)** |
| **Pat.188B** | **HLADRKLSL (B*07)** |
| **Pat.224B** | **VPANTYNALK (A*03)** |
| CLT Ant 1 > | GERRSGIAK**VVRGGAGFAAR**LQGSVTLV**QQGWFFPR**LGGCQAWWRMGAVVWCGELLTCTS |
| **Pat.224B** | **RLGGCQAWWR (A*03)** |

ФИГ. 52

*LILDFQPLQL* (A*02)

Панель B: Последовательность CLT-антигена 2 (аннотированная с пептидами, обнаруженными с помощью масс-спектрометрии) над пептидами, обнаруженными HERVFEST

| | |
|---|---|
| CLT Ant 2 > | MTGVLIRRGDLVTDMVACRIKTFRGHTEKAAICKTRKESSAETSP**ADSLILDF**QPLQLM**SSFSTLASLDK** |
| **Pat.222B** | *LILDFQPLQL* **(A*02)** |
| **Pat.222B** | **LMSSFSTLASL (A*02)** |
| **Pat.222B** | SLILDFQPL |
| **Pat.224B** | **LMSSFSTLA (A*02)** |
| **Pat.224B** | **QLMSSFSTLA (A*02)** |
| **Pat.224B** | *MVACRIKTFR* **(A*03)** |
| **Pat.254C** | *MVACRIKTFR* **(A*11)** |
| **Pat.254C** | VTDMVACRIK **(A*11)** |
| **Pat.225B** | **SSFSTLASLDK (A*03)** |
| **Pat.225B** | **SPADSLIL** **(B*07)** |
| **Pat.225B** | SLILDFQPL |
| **Pat.271B** | **LVTDMVACRI (A*01)** |
| **Pat.271B** | **LILDFQPLQL (A*01)** |
| **Pat.271B** | **MSSFSTLASL (A*01)** |
| **Pat.188B** | **SLILDFQPL** |
| **Pat.293B** | SLILDFQPL |



ФИГ. 52 (продолж.)

Панель C: Последовательность CLT-антигена 3 (аннотированная с пептидами, обнаруженными с помощью масс-спектрометрии) над пептидами, обнаруженными HERVFEST

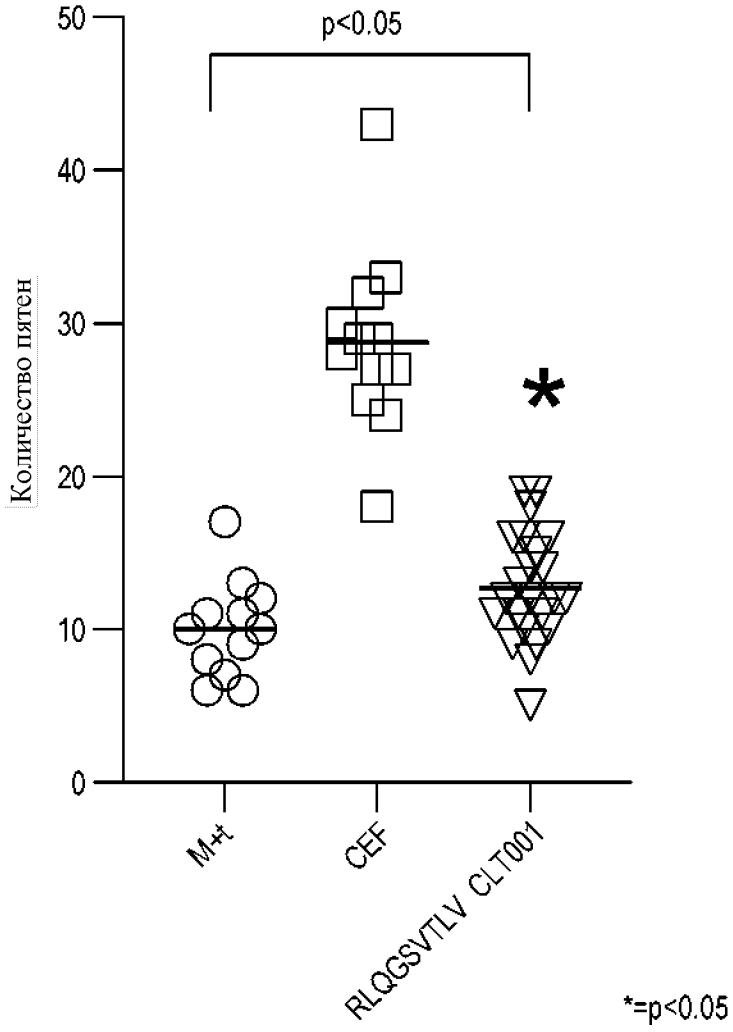
| | |
|---|---|
| CLT Ant 3 > | MNTPNIVSLRAHQPEVGIIPSVLLMRPLRIKGVFHHIHSPLHGENQGFTLCLQGAPPSSSV |
| Pat.254C | VLLMRPLRIK (A*11) |
| Pat.225B | MRPLRIKGVF (B*07) |
| Pat.271B | NTPNIVSLRA (A*01) |

Панель D: Последовательность CLT-антигена 4 (аннотированная с пептидами, обнаруженными с помощью масс-спектрометрии) над пептидами, обнаруженными HERVFEST

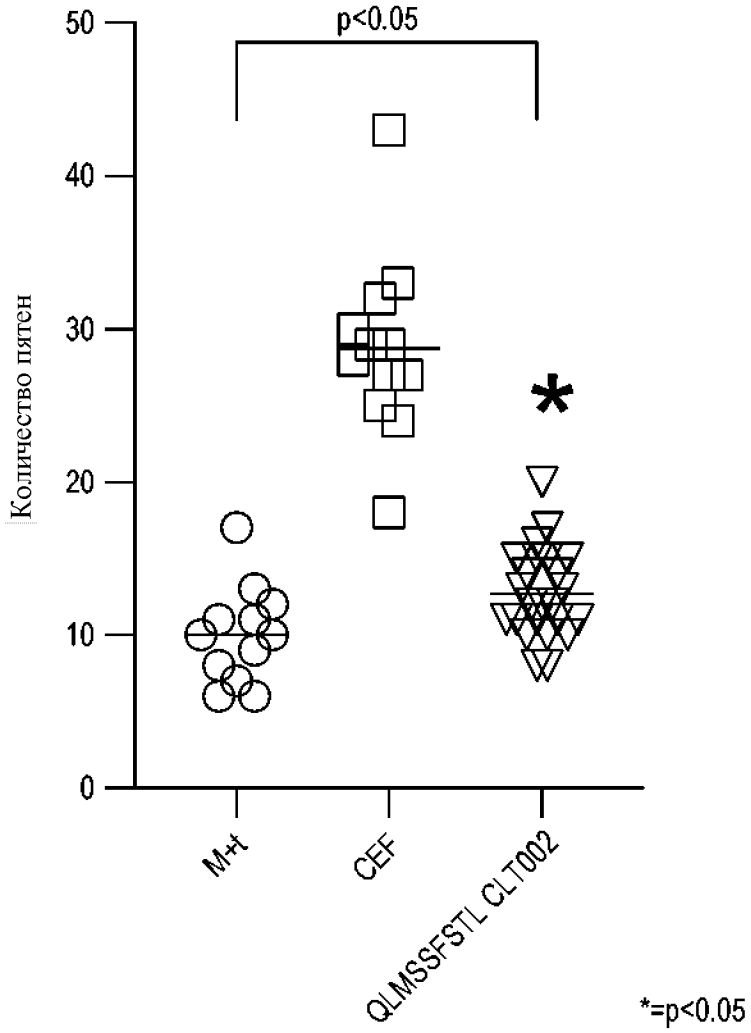
| | |
|---|---|
| CLT Ant 4 > | MAKTKGSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWLPEPMLSSSPPSSTAPLLGSEPLRHWEASLSR |
| Pat.222B | *FLFLELWL* (A*02) |
| Pat.222B | *SVFRELHPA* (A*02) |
| Pat.224B | FLFLELWL (A*02) |
| Pat.225B | SPPSSTAPL (B*07) |



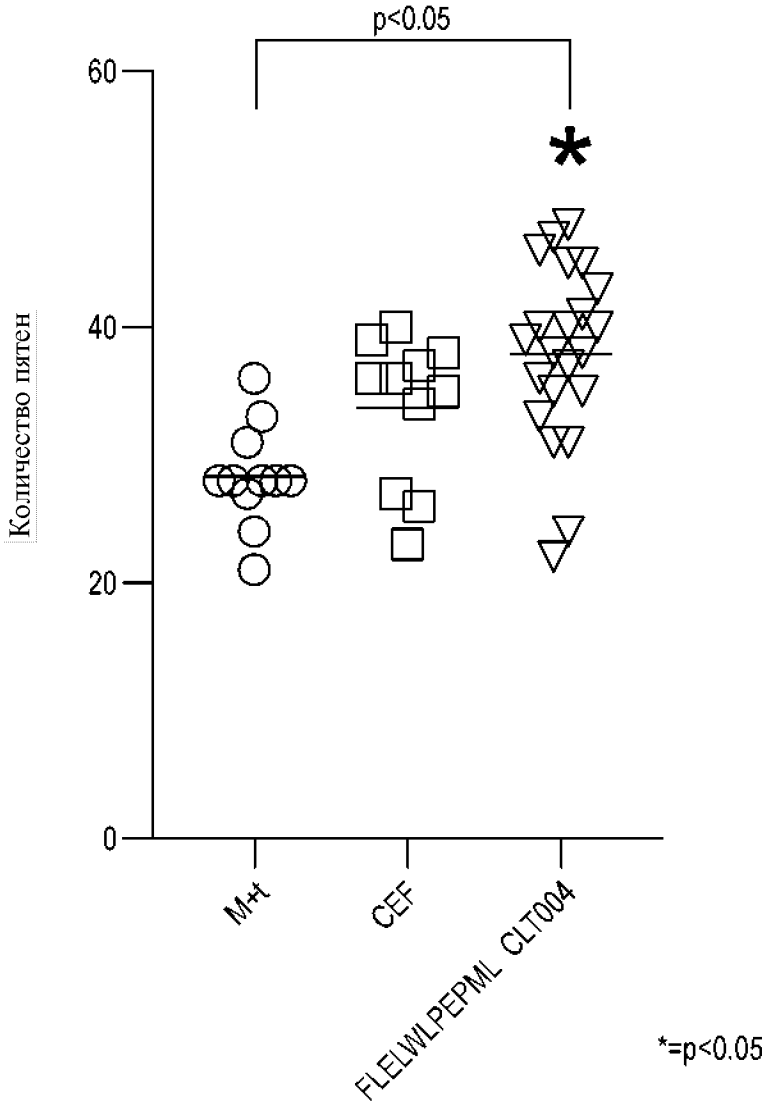
ФИГ. 52 (продолж.)


p<0.05
50
40
30
20
10
0
Количество пятен
*
M+t
CEF
RLQGSVTLV CLT001
*=p<0.05

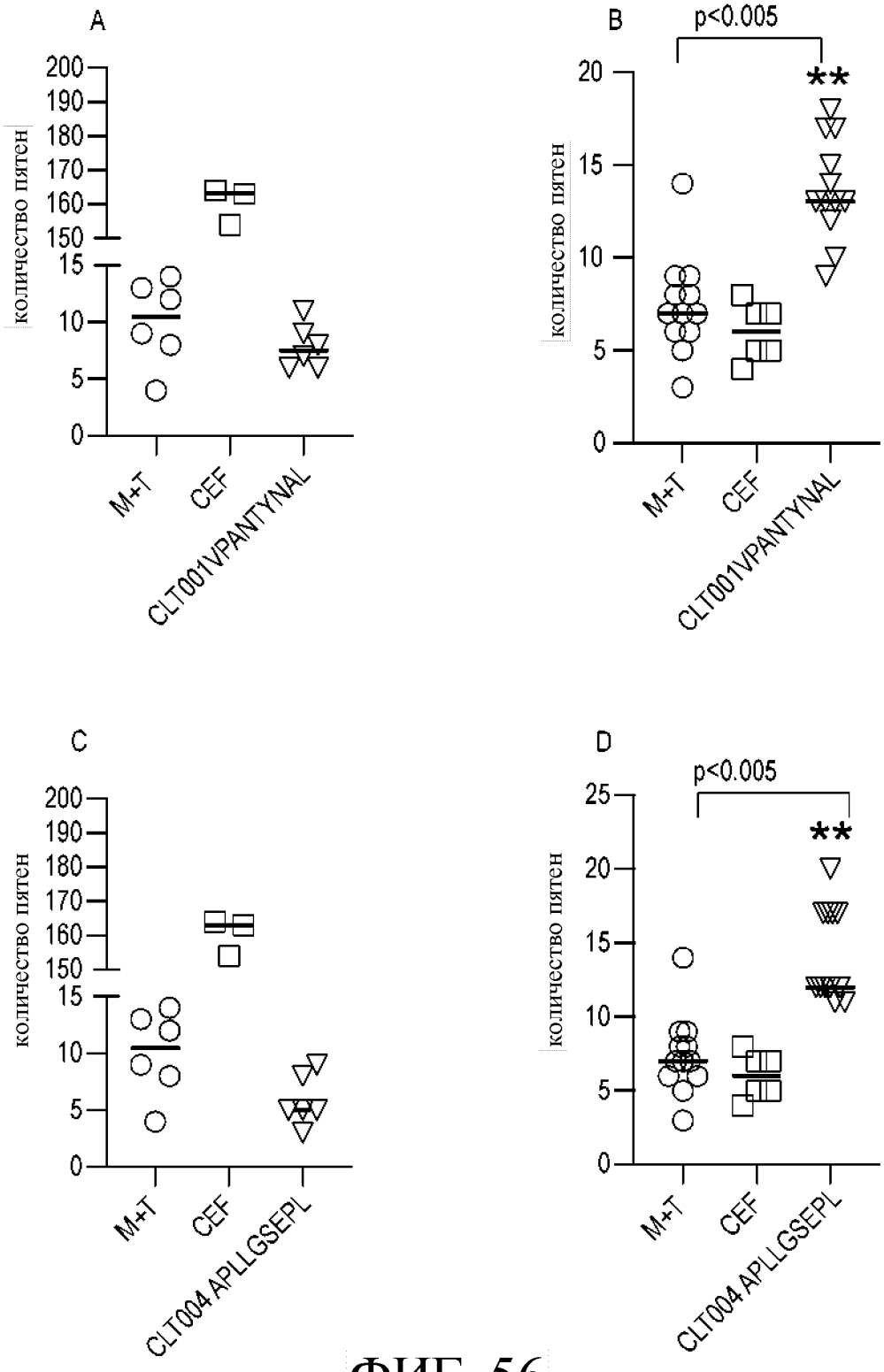
ФИГ. 53


p<0.05
50
40
30
20
10
0
Количество пятен
M+I
CEF
QLMSSFSTL CLT002
*=p<0.05

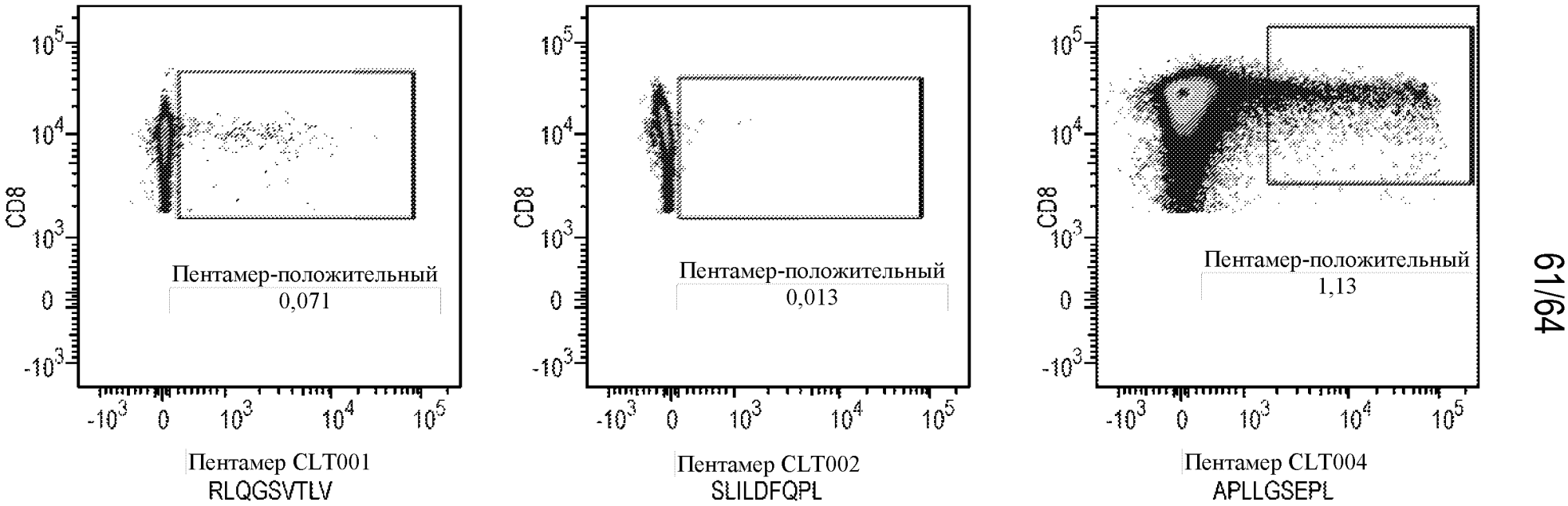
ФИГ. 54


p<0.05
60
40
20
0
Количество пятен
*
M+t
CEF
FLELWLPEPML CLT004
*=p<0.05

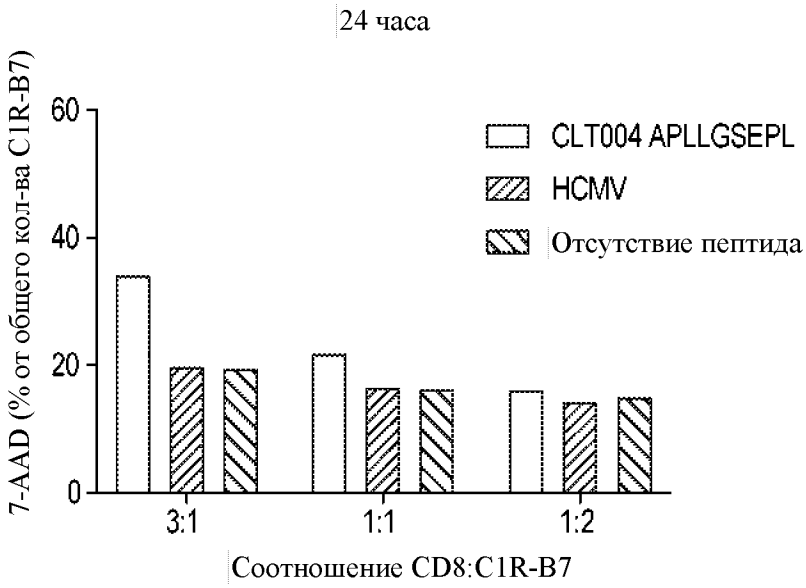
ФИГ. 55


A
количество пятен
200
190
180
170
160
150
15
10
5
0
M+T
CEF
CLT001VPANTYNAL
B
p<0.005
**
количество пятен
20
15
10
5
0
M+T
CEF
CLT001VPANTYNAL
C
количество пятен
200
190
180
170
160
150
15
10
5
0
M+T
CEF
CLT004APLLGSEPL
D
p<0.005
**
количество пятен
25
20
15
10
5
0
M+T
CEF
CLT004APLLGSEPL

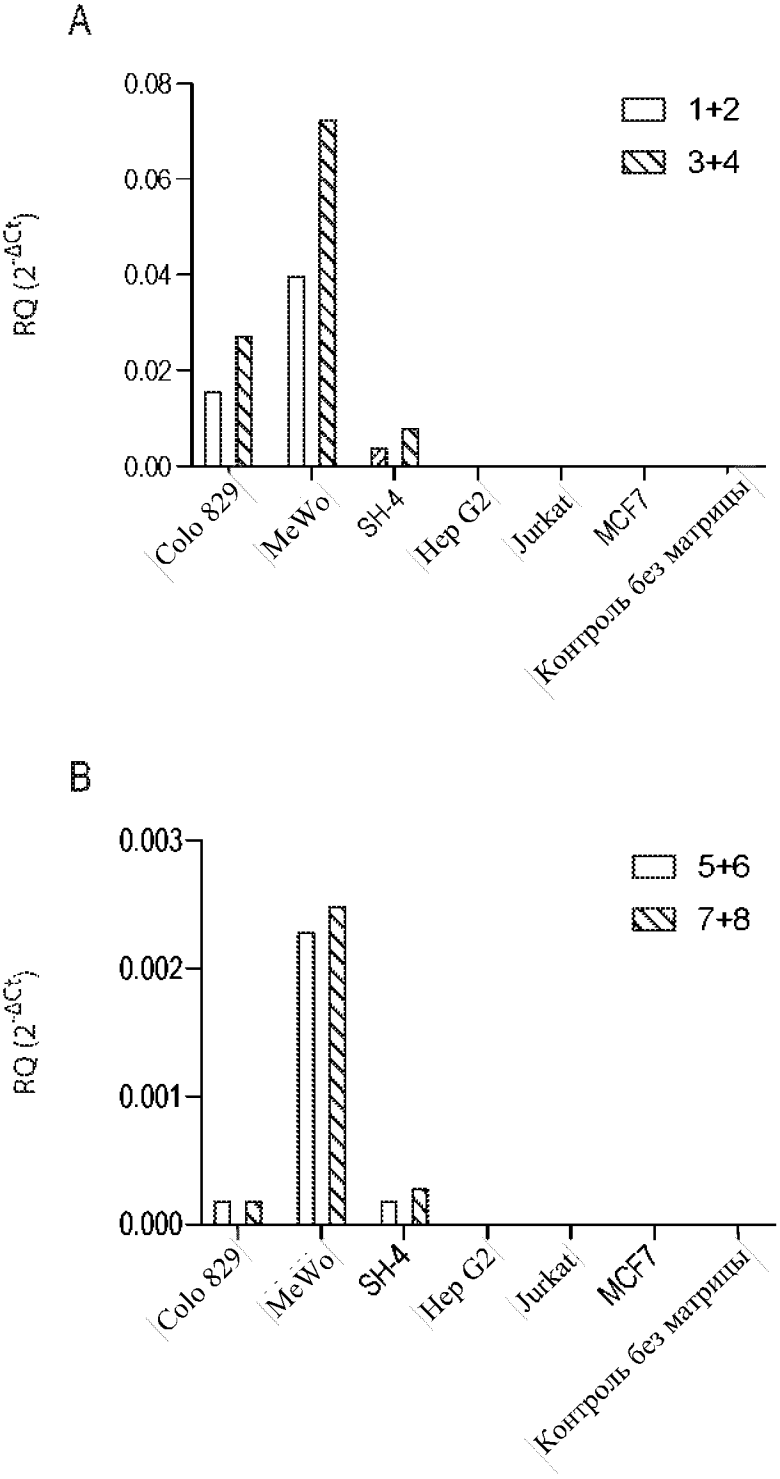
ФИГ. 56


CD8
Пентамер-положительный
0,071
Пентамер CLT001
RLQGSVTLV
Пентамер-положительный
0,013
Пентамер CLT002
SLILDFQPL
Пентамер-положительный
1,13
Пентамер CLT004
APLLGSEPL

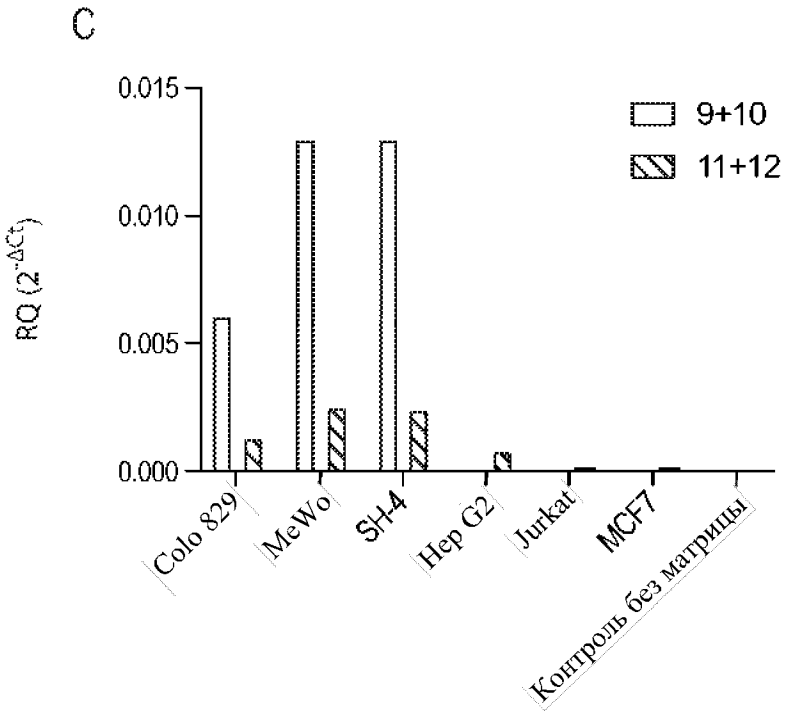
ФИГ. 57


24 часа
7-AAD (% от общего кол-ва C1R-B7)
60
40
20
0
3:1
1:1
1:2
Соотношение CD8:C1R-B7
CLT004 APLLGSEPL
HCMV
Отсутствие пептида

ФИГ. 58


A
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
RQ (2^-ΔCt)
1+2
3+4
Colo 829
MeWo
SH-4
Hep G2
Jurkat
MCF7
Контроль без матрицы
B
0.003
0.002
0.001
0.000
RQ (2^-ΔCt)
5+6
7+8
Colo 829
MeWo
SH-4
Hep G2
Jurkat
MCF7
Контроль без матрицы

ФИГ. 59




ФИГ. 59 (продолжение)