

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041713**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.24

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

(21) Номер заявки
201890027

(22) Дата подачи заявки
2016.07.14

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

(31) 1512369.8; 62/192,670

(32) 2015.07.15

(33) GB; US

(43) 2018.06.29

(86) PCT/EP2016/066706

(87) WO 2017/009400 2017.01.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(56) MICHAL BASSANI-STERBERG ET AL.:
"Mass Spectrometry of Human Leukocyte Antigen
Class I Peptidomes Reveals Strong Effects of Protein
Abundance and Turnover on Antigen Presentation",
MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol.
14, no. 3, 2 March 2015 (2015-03-02), pages
658-673, XP055272560, US, ISSN: 1535-9476, DOI:
10.1074/mcp.M114.042812, page 661, column 1,
paragraph 3; table S1; sequence 13448
WO-A1-2007028573
WO-A2-2014011465

(72) Изобретатель:
**Шустер Хайко, Пепер Джанет, Вагнер
Филипп, Раммензее Ханс-Георг (DE)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Карпенко О.Ю.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

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

B1**041713****041713****B1**

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

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

Уровень техники

Эпителиальный рак яичника (ЭРЯ) остается основной причиной смерти от злокачественных заболеваний женских половых органов в западных странах, являясь причиной приблизительно 22000 новых диагностированных случаев и 14000 смертельных исходов в США в 2014 г. (1). Единственным имеющимся вариантом радикального лечения является хирургическое удаление опухоли на ранней неметастатической стадии заболевания. Однако из-за отсутствия специфических симптомов на ранних стадиях большинству пациентов (>70%) диагноз ставится на III или IV стадии заболевания. Несмотря на прогресс в разработке схем химиотерапевтического лечения и недавнего одобрения препарата бевацизумаб для лечения первой линии, у большинства пациентов возникают рецидивы в течение нескольких месяцев или лет после первичного лечения (2, 3).

Принимая во внимание серьезные побочные эффекты и высокие расходы, связанные с лечением рака, существует необходимость идентифицировать факторы, которые могут быть использованы для лечения рака вообще и рака яичника в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и рака яичника в частности, что позволит лучше ставить диагноз, составлять прогноз и предсказывать успех лечения.

Иммунотерапия рака представляет собой вариант специфического воздействия на раковые клетки при снижении до минимума побочных эффектов. В иммунотерапии рака находит применение существование опухолеассоциированных антигенов. Актуальная классификация опухолеассоциированных антигенов (ТАА) включает следующие основные группы:

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

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

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

г) опухолеспецифические антигены: данные уникальные ТАА образуются в результате мутаций нормальных генов (таких как β -катенин, CDK4 и т.д.). Некоторые из этих молекулярных изменений ассоциированы с неопластической трансформацией и/или прогрессией. Опухолеспецифические антигены в основном способны индуцировать сильные иммунные ответы, не заключая в себе риска аутоиммунных реакций по отношению к нормальным тканям. С другой стороны, данные ТАА в большинстве случаев подходят только для определенной опухоли, на которой они были идентифицированы, и обычно не являются общими для многих отдельных опухолей. Опухолевая специфичность (или ассоциация) пептида может также возникнуть, если пептид образован из опухолевого (опухолеассоциированного) экзона в

случае белков с опухолеспецифическими (-ассоциированными) изоформами;

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

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

В течение двух последних десятилетий на основании различных фактов, выявленных в клинических условиях, ЭРЯ был признан высокоиммуногенной опухолью. Исходя из наблюдения частой инфильтрации опухолей иммунными клетками ЭРЯ находится среди первых видов рака, в которых может быть установлена неоспоримая ассоциация инфильтрации Т-клетками и клинического прогноза. В популяции инфильтрующих Т-клеток были выявлены опухоль-реактивные и антигенспецифические Т-клетки. Резидентные регуляторные Т-лимфоциты (Tregs) опухоли, напротив, отрицательно коррелируют с клиническим исходом. Кроме того, иммуностимулирующие цитокины, как было показано, вызывают очевидные ответы опухоли у отдельных пациентов. Эффективность иммунотерапевтических подходов в лечении рака была продемонстрирована недавними разработками и одобрением ингибиторов иммунной контрольной точки в лечении меланомы. Более того, вакцинация на основе антигенспецифических пептидов и адоптивный перенос Т-клеток начинает демонстрировать успех при меланоме и других иммуногенных опухолях, например почечно-клеточной карциноме. Персонализированная иммунотерапия уже демонстрирует лечебный потенциал, и для отдельных пациентов были продемонстрированы впечатляющие результаты.

Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентуются молекулами главного комплекса гистосовместимости человека (МНС). Антигены, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, т.е. их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и по сравнению с не измененными клетками того же происхождения обычно имеют повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

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

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

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

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

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

МНС II класса (Dengjel et al., 2006).

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

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

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

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена иммунными клетками, то выделение пептидов II класса непосредственно из первичных опухолей ранее считалось невозможным. Тем не менее Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1760088 B1).

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

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

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

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

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

Поэтому антигены ТАА являются отправной точкой для разработки терапии на основе Т-клеток, включающей противоопухолевые вакцины, но не ограничивающейся ими. Методы идентификации и определения характеристики ТАА обычно основаны на использовании Т-клеток, которые могут быть

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

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

Краткое изложение сущности изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, где указанный вариант связывается с МНС и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение относится далее к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8-100, предпочтительно 8-30 и наиболее предпочтительно 8-14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. Все пептиды табл. 1 и 2 связываются с HLA-A*02. Пептиды из табл. 2 были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скринингов с высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями. Пептиды из табл. 3 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. Пептиды из табл. 4 далее полезны для постановки диагноза и/или лечения различных других злокачественных заболеваний, которые включают избыточную экспрессию или избыточную презентацию соответствующего базового полипептида.

Таблица 1

Пептиды в соответствии с настоящим изобретением; X=S, R или G

SEQ ID No.	Последовательность	Символ гена	Связывание с HLA
1	QFITSTNTF	MUC16	A*24:02
2	STETSTVLY	MUC16	A*01
3	AHSKITTAM	MUC16	B*39:01
4	AVKTETSTSER	MUC16	A*31:01
5	AVTNVRTSI	MUC16	B*13
6	DALTPLVTI	MUC16	B*51:01
7	DALVLKTV	MUC16	B*51
8	DPYKATSAV	MUC16	B*51
9	EPETTSFITY	MUC16	B*35
10	ERSPVIQTL	MUC16	B*39:01
11	ETILTFHAF	MUC16	A*25
12	EVISSRGTSM	MUC16	A*25
13	EVITSSRTTI	MUC16	A*25
14	EVTSSGRTSI	MUC16	A*25

15	FPEKTTHSF	MUC16	B*35
16	FPHSEETTM	MUC16	B*35
17	FPHSEITTL	MUC16	B*35
18	FQRQQQTAL	MUC16	B*15:01
19	GDVPRPSSL	MUC16	B*08:01
20	GHESHSPAL	MUC16	B*39:01
21	GHTTVSTSM	MUC16	B*39:01
22	GTHSPVTQR	MUC16	A*31:01
23	GTSGTPVSK	MUC16	A*11
24	HPDPQSPGL	MUC16	B*35
25	IPRVFTSSI	MUC16	B*51
26	ISDEVVTRL	MUC16	C*05
27	ISIGTIPRI	MUC16	B*15:17
28	ISKEDVTSI	MUC16	B*15:17
29	ITETSAVLY	MUC16	A*01
30	ITRLPTSSI	MUC16	B*15:17
31	KDTAHTeam	MUC16	B*44:02
32	KEDSTALVM	MUC16	B*40/B*44
33	KEVTSSSVL	MUC16	B*40/B*44/?
34	LPHSEITTL	MUC16	B*35
35	LTISTHKT	MUC16	B*15:17
36	LTKSEERTI	MUC16	B*15:17
37	RDSLYVNGF	MUC16	B*44:02
38	RETSTSQKI	MUC16	B*18:01
39	RSSGVTFSR	MUC16	A*31:01
40	SAFESHSTV	MUC16	B*51
41	SATERSASL	MUC16	C*03/?
42	SENSETTAL	MUC16	B*40/B*44/?
43	SEQRTSPSL	MUC16	?
44	SESPSTIKL	MUC16	B*40/?
45	SPAGEAHS	MUC16	B*07/B*56
46	SPAGEAHSLLA	MUC16	B*56:01
47	SPHPVSTTF	MUC16	B*07:02
48	SPHPVTALL	MUC16	B*07:02
49	SPLFQRSSL	MUC16	B*07:02
50	SPQNLRLNTL	MUC16	B*35/B*07:02
51	SPRLNTQGNTAL	MUC16	B*07:02
52	SPSEAITRL	MUC16	B*07:02
53	SPSKAFASL	MUC16	B*35/B*07:02
54	SPSSPTPKV	MUC16	B*07:02
55	SPSSQAPVL	MUC16	B*07:02

56	SQGFSHSQM	MUC16	B*15:01
57	SRTEVISSR	MUC16	B*27
58	SSAVSTTTI	MUC16	B*15:17
59	SSPLRVTSI	MUC16	n/a
60	STASSSLSK	MUC16	A*11
61	STQRVTTSM	MUC16	B*07?
62	STSQEIHSATK	MUC16	A*11
63	SVLADLVTTK	MUC16	A*03:01
64	SVPDILSTSW	MUC16	A*24:02
65	TAGPTTHQF	MUC16	C*03
66	TEISSRSTSI	MUC16	B*49:01
67	TENTGKEKL	MUC16	B*40/B*44
68	TETEAHVF	MUC16	B*18
69	TEVSRTEVI	MUC16	B*49:01
70	TEXVLQGLL	MUC16	B*40/B*44/?
71	TPGGTRQSL	MUC16	B*07:02/B*35
72	TPGNRAISL	MUC16	B*07:02/B*35
73	TPNSRGETSL	MUC16	B*07:02
74	TSGPVTEKY	MUC16	B*35
75	TSPAGEAHSI	MUC16	?
76	VHESHSSVL	MUC16	B*39:01
77	VPRSAATTL	MUC16	B*07:02/B*35
78	VTSAVGRSI	MUC16	B*15:17
79	VTSSRSTSI	MUC16	B*15:17
80	YPDPKASSAM	MUC16	B*35
81	AAWLRSAAA	MMP11	B*55/B*56
82	APAAWLRSAA	MMP11	B*55/B*56
83	APAAWLRSAAA	MMP11	B*55/B*56
84	LPSPVDAAF	MMP11	B*35
85	RGVPSEIDAAF	MMP11	B*58
86	EAGPPAFYR	ESR1	A*66
87	STSSHSLQK	ESR1	A*03/A*11
88	APHLHLSA	KLK10	B*56:01
89	APHLHLSAA	KLK10	B*56:01
90	RALAKLLPL	KLK10	B*08/A*02
91	SAASGARAL	KLK10	C*03
92	VLVDQSWVL	KLK10	A*02
93	DYLKRFYLY	MMP7	A*24
94	SETKNANSL	MMP7	B*44/B*41/B*40
95	SSDPNAVMY	MMP7	A*01
96	YPFDGPGNTL	MMP7	B*35

97	YPFDGPGNTLAH	MMP7	B*35
98	NEIERVFW	EYA2	B*44:02
99	NVGGLIGTPK	EYA2	A*03
100	RVKEMYNTY	EYA2	A*30/A*32
101	SAPLRVSQL	EYA2	?
102	DTDEYVLKY	EFHC1	A*01
103	KDSTKTAF	EFHC1	B*44
104	SKAPVLT	EFHC1	B*15:03
105	AEYTDVLQKI	EPS8L1	B*49
106	EYTDVLQKI	EPS8L1	A*24
107	RPHLTSDA	EPS8L1	B*56
108	RPHLTSDAV	EPS8L1	B*56
109	RPHLTSDAVA	EPS8L1	B*56
110	SAKSIYEQ	EPS8L1	A*31
111	SPEEGARVY	EPS8L1	B*35
112	SQYPVNHLV	EPS8L1	B*15
113	YPVNHLVTF	EPS8L1	B*35
114	AAASAIKVI	IDO1	C*12
115	IHDHVNPKAFF	IDO1	B*38
116	NPKAFFSVL	IDO1	B*07
117	NPSVREFVL	IDO1	B*35
118	RSYHLQIVTK	IDO1	A*11/A*03
119	RYMPPAHRNF	IDO1	A*24
120	TEFEQYLHF	SOX17	B*18/B*44
121	VSDASSAVYY	SOX17	A*01
122	AEIEADRSY	LAMC2	B*44
123	AQKVDTRAK	LAMC2	A*03
124	HPSAHDVIL	LAMC2	B*35:03
125	RIKQKADSL	LAMC2	B*08
126	SEGASRSLGL	LAMC2	B*37
127	SVDEEGLVLL	LAMC2	A*02
128	SVHKITSTF	LAMC2	A*25
129	TREATQAEI	LAMC2	B*39
130	VYFVAPAKF	LAMC2	A*24
131	APQSAHAAF	SGPL1	B*07
132	ETIIIFHSL	EYA3	A*25
133	TELLVKAY	SGPL1	B*18
134	WQEGRASGT	SGPL1	B*15
135	IRSENFEE	CRABP2	B*39
136	KIAVAAASK	CRABP2	A*03
137	NVMLRKIAV	CRABP2	B*08

138	RELTNDGELIL	CRABP2	B*40/B*44
139	VAAASKPAV	CRABP2	?
140	SPNAIFKAL	SOX9	B*07
141	SSKNKPHVKR	SOX9	A*31
142	TPASAGHVV	SOX9	B*07
143	YTDHQNSSSY	SOX9	A*01
144	AEVLLPRL	MSLN	B*40
145	AVLPLTVAEVQK	MSLN	A*03
146	LPTARPLL	MSLN	B*07
147	RVRELAVAL	MSLN	A*02
148	NLPFLPRV	MLPH	A*02
149	RVHPPEEQGW	MLPH	B*58
150	TVKPSGKPR	MLPH	A*31
151	YYEHVKARF	MLPH	A*24
152	AARPAGATL	ERBB2	B*07
153	MPNPEGRTYF	ERBB2	B*35
154	FYIKTSTTV	CRABP2	A*24
155	RTTEINFKV	CRABP2	A*02
156	YIKTSTTV	CRABP2	B*08
157	GQAAQGPTI	DDR1	B*15
158	HRFLAEDAL	DDR1	B*39:01
159	EEVARFYAA	FOLR1	B*45
160	NPNEEVARF	FOLR1	B*35
161	NPNEEVARFY	FOLR1	B*35
162	KSQTLLGK	ULK1	A*11/A*03
163	DELISKSF	YPEL1	B*18
164	HDELISKSF	YPEL1	B*35
165	GRAYLFNSV	YPEL1	B*27
166	YLFNSVNV	YPEL1	A*02
167	APDNRPAL	MUC1	B*07/B*35
168	HHSDTP TTL	MUC1	B*38/B*39
169	HPMSEYPTY	MUC1	B*35
170	LQRDISEM	MUC1	B*51
171	LQRDISEMF	MUC1	B*51
172	AIAEIGNQL	MMP9	A*02
173	DVAQVTGALR	MMP9	A*68
174	SEDLPRVI	MMP9	B*49/B*40
175	APDAKSFVL	LGALS1	B*35
176	EVAPDAKSF	LGALS1	A*25
177	FPFQPGSVAEV	LGALS1	B*35
178	GEVAPDAKSFVL	LGALS1	B*40
179	LPDGYEFKF	LGALS1	B*35

Таблица 2

Дополнительные пептиды в соответствии
с настоящим изобретением; X=S, R или G

SEQ ID No.	Последовательность	Класс МНС	Символ гена
180	DKAFTAATTEVSR	II	MUC16
181	ELGPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
182	ELGPYTLDRNSLYVNG	II	MUC16
183	FDKAFTAATTEVSR	II	MUC16
184	GPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
185	LGPYTLDRDLSLYVN	II	MUC16
186	LGPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
187	LGPYTLDRNSLYVNG	II	MUC16
188	STETITRLSTFPFVTG	II	MUC16
189	ELQWEQAQDYLKR	II	MMP7
190	ELQWEQAQDYLKRF	II	MMP7
191	GINFLYAATHELGHS	II	MMP7
192	LQWEQAQDYLKR	II	MMP7
193	LQWEQAQDYLKRF	II	MMP7
194	SELQWEQAQDYLKR	II	MMP7
195	SELQWEQAQDYLKRF	II	MMP7
196	VPYNILTPYPGPR	II	EPS8L1
197	YVPYNILTPYPGPR	II	EPS8L1
198	GNWKIIRSENFEEL	II	CRABP2
199	GNWKIIRSENFEELLK	II	CRABP2
200	NWKIIRSENFEEL	II	CRABP2
201	PNFSGNWKIIRSENF	II	CRABP2
202	VMLRKIAVAAASKPA	II	CRABP2
203	WKIIRSENFEEL	II	CRABP2
204	LQRYSSDPTGALT	II	EGFR
205	NPTTYQMDVNPEGK	II	EGFR
206	NPTTYQMDVNPEGKY	II	EGFR
207	DDGGQFVVTNPVNNDG	II	CDH1
208	DKEGKVFYSITGQGADTPP	II	CDH1
209	DKEGKVFYSITGQGADTPPV	II	CDH1
210	DKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
211	DKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
212	DPELPDKNMFTINRNTG	II	CDH1
213	DPELPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1

041713

214	DPELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
215	DPELPDKNMFTINRNTGVISV	II	CDH1
216	DPELPDKNMFTINRNTGVISV V	II	CDH1
217	DPELPDKNMFTINRNTGVISV VT	II	CDH1
218	DVNTYNAAIAYTILS	II	CDH1
219	DVNTYNAAIAYTILSQ	II	CDH1
220	EGKVFYSITGQGADT	II	CDH1
221	EGKVFYSITGQGADTPP	II	CDH1
222	EGKVFYSITGQGADTPPV	II	CDH1
223	ELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
224	GGQFVVTNPVNN	II	CDH1
225	GKVFYSITGQGADT	II	CDH1
226	GPFPKNLVQIKSNKDK	II	CDH1
227	GPFPKNLVQIKSNKDKE	II	CDH1
228	GPFPKNLVQIKSNKDKEGK	II	CDH1
229	KNMFTINRNTGVI	II	CDH1
230	KNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
231	LPDKNMFTINRNTG	II	CDH1
232	LPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
233	LPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
234	PELPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
235	PELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
236	QDPELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
237	SQDPELPDKNMFTINRNTGVI S	II	CDH1
238	SQDPELPDKNMFTINRNTGVI SVVT	II	CDH1
239	SVPRYLPRPANPDE	II	CDH1
240	TDGVITVKRPLRFHNPQ	II	CDH1
241	TRAELEDREDFEHVK	II	CDH1
242	VPRYLPRPANPDE	II	CDH1
243	ALEFRALEPQGILL	II	AGRN
244	ALEFRALEPQGLLL	II	AGRN
245	DTRIFFVNPAPPY	II	AGRN
246	DTRIFFVNPAPPYL	II	AGRN
247	DTRIFFVNPAPPYLW	II	AGRN
248	DTRIFFVNPAPPYLWP	II	AGRN
249	DTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
250	EFRALEPQGLLL	II	AGRN
251	GAPVPAFEGRSFLAFPTL	II	AGRN

252	GDTRIFFVNPAPPYLWP	II	AGRN
253	GDTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
254	IVDVHFDPTTAFRAPD	II	AGRN
255	KVRVWRYLKGKDLVAR	II	AGRN
256	LALEFRALEPQGILL	II	AGRN
257	LEFRALEPQGILL	II	AGRN
258	SGPFLADFNQFISH	II	AGRN
259	TGDTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
260	TRIFFVNPAPPYL	II	AGRN
261	VDVHFDPTTAFRAPD	II	AGRN
262	VDVHFDPTTAFRAPDV	II	AGRN
263	VRVWRYLKGKDLVAR	II	AGRN
264	APVPAFEGRSFLAFPT	II	AGRN
265	APVPAFEGRSFLAFPTL	II	AGRN
266	ALRGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
267	DLPGRFVAESAELVLLP	II	MSLN
268	DLPGRFVAESAELVLLPR	II	MSLN
269	GQPIIRSIPQGIV	II	MSLN
270	GQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
271	LGQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
272	LPAALACWVGVRGSL	II	MSLN
273	LPGRFVAESAELVLL	II	MSLN
274	LPGRFVAESAELVLLP	II	MSLN
275	LPGRFVAESAELVLLPR	II	MSLN
276	LRGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
277	PGRFVAESAELVLLPR	II	MSLN
278	PGRFVAESAELVLLPRL	II	MSLN
279	QPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
280	RGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
281	SRTLAGEGQEAAPL	II	MSLN
282	STERVRELAVALAQK	II	MSLN
283	TDAVLPLTVAEVQ	II	MSLN
284	VAEVQKLLGPHVEG	II	MSLN
285	VAEVQKLLGPHVEGLK	II	MSLN
286	VLGQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
287	VRGSLLEADVRLG	II	MSLN
288	VRGSLLEADVRLGG	II	MSLN
289	LPAALACWVGVRGSL	II	MSLN
290	AIKVLRENTSPKANKE	II	ERBB2
291	DPSPLQRYSEDPTVPLPS	II	ERBB2
292	DPSPLQRYSEDPTVPLPSE	II	ERBB2
293	ELVSEFSRMARD	II	ERBB2
294	ELVSEFSRMARDPQ	II	ERBB2
295	IPVAIKVLRENTSPKANKE	II	ERBB2
296	RRLLQETELVEPLTPS	II	ERBB2
297	SPQPEYVNPDPVRPQPP	II	ERBB2
298	VKPDLSYMPIWKFPDE	II	ERBB2
299	ASGMRYLATLNFVHR	II	DDR1
300	IASGMRYLATLNFVHR	II	DDR1
301	KEVKIMSRLKDPN	II	DDR1
302	LNQFLSAHQLEDK	II	DDR1
303	NPAYRLLLATYARPP	II	DDR1
304	NPAYRLLLATYARPPR	II	DDR1
305	SNPAYRLLLATYARPP	II	DDR1
306	SNPAYRLLLATYARPPR	II	DDR1
307	DPSTDYYQELQRDISE	II	MUC1
308	VETQFNQYKTEAASR	II	MUC1
309	GRQVWVYTGASVLGPR	II	MMP9
310	NQLYLFKDGKYWRFSEG	II	MMP9
311	RQVWVYTGASVLGPR	II	MMP9
312	SGRQVWVYTGASVLG	II	MMP9
313	SGRQVWVYTGASVLGP	II	MMP9
314	SGRQVWVYTGASVLGPR	II	MMP9
315	VDPRSASEVDRMFPG	II	MMP9
316	GEVAPDAKSFVLN	II	LGALS1
317	LTVKLPDGYEFKFPNRLNL	II	LGALS1
318	VRGEVAPDAKSFVLN	II	LGALS1
319	VRGEVAPDAKSFVLNLG	II	LGALS1

Таблица 3

Дополнительные пептиды, полезные
в терапии рака; X=S, R или G

SEQ ID No.	Последовательность	Класс МНС	Символ гена
320	ATSKIPLAL	I	MUC16
321	ITSSRTTI	I	MUC16
322	LNFTITNLQ	I	MUC16
323	TATSPMVPAS	I	MUC16
324	TTLPESRPS	I	MUC16
325	VELRVLALP	I	LRFN4
326	AEDNLIHKF	I	NLRP2
327	REDLERLGV	I	NLRP7
328	DTKDPVTEW	I	TLR7
329	ILISKLLGA	I	TLR7
330	SESLRTEF	I	TLR7
331	VLAELVAKL	I	TLR7
332	INTSILLIF	I	TLR3
333	ALQPLLHTV	I	IL17RD
334	RLMDNLPQL	I	IL17RD
335	LIISPTREL	I	DDX10
336	ADSKVLLF	I	WDR35
337	DSLLEQANNAI	I	WDR35
338	DYQGIKFVKR	I	WDR35
339	EVVGYFGRF	I	WDR35
340	KYVKGLISI	I	WDR35
341	SIGTPLDPK	I	WDR35
342	TASDKILIV	I	WDR35
343	GVIKVISGF	I	NOC3L
344	KVKLENKLK	I	NOC3L
345	SSSEPVHAK	I	NOC3L
346	SSSEPVHAKK	I	NOC3L
347	LSDQLAQAI	I	DNASE1
348	LSDIVIEKY	I	WDR27
349	SLDDHVAV	I	WDR27
350	SQIDQQNSV	I	LRIF1
351	STIDPSGTRSK	I	LRIF1
352	VFRDQEPKI	I	LRIF1
353	VLREKEAAL	I	LRIF1
354	TRLQQAQAL	I	POLR2J3
355	VAAPEHISY	I	POLR2J3
356	NSKKKVAL	I	DDX52
357	QNSKKKVAL	I	DDX52
358	RDNTVHSF	I	DDX52
359	KQVSEFMTW	I	RASGEF1B
360	KTKPQSIQR	I	RASGEF1B
361	THIELERL	I	RASGEF1B
362	IAPKILQL	I	RASGEF1B
363	DIASVSGRW	I	BICC1
364	KPKQPSKSV	I	BICC1
365	MPAETIKEL	I	BICC1
366	SAVKEGTAM	I	BICC1
367	EEEKLQAAF	I	COMMD10
368	DEFNLQKM	I	EMC1
369	DEYKVTAFA	I	EMC1
370	ETNIGGLNW	I	EMC1

371	FPQTALVSF	I	EMC1
372	GEFGKKADGLL	I	EMC1
373	GSMGSFSEK	I	EMC1
374	IFLIDGVTGRI	I	EMC1
375	IPPEVQRI	I	EMC1
376	IPYSPDVQI	I	EMC1
377	QVAPPVLKR	I	EMC1
378	TEKNVIAAL	I	EMC1
379	VGKVKFASL	I	EMC1
380	VPFSHVNI	I	EMC1
381	VVYQYWNTK	I	EMC1
382	YPSKQFDVL	I	EMC1
383	AADDSADKV	I	ZNF217
384	HHKEKQTDV	I	ZNF217
385	KQTDVAAEV	I	ZNF217
386	KSAFPAQSK	I	ZNF217
387	NEVVQVHAA	I	ZNF217
388	SEDLNKHVL	I	ZNF217
389	GETIHIPTM	I	BCAT1
390	GPKLASRIL	I	BCAT1
391	GVKKPTKAL	I	BCAT1
392	KEKDPNNL	I	BCAT1
393	KVSERYLTM	I	BCAT1
394	LPVFDKEEL	I	BCAT1
395	LSKLTDIQY	I	BCAT1
396	DLSNIINKL	I	WDR12
397	RVWDVESGSLK	I	WDR12
398	SPTTSHVGA	I	WDR12
399	VEIEYVEKY	I	WDR12
400	VERNKVKAL	I	WDR12
401	REAVSKEDL	I	PANK2
402	IMGGNSILHSA	I	STXBP6
403	KQFEGSTSF	I	STXBP6
404	EEFLRQEHF	I	OASL
405	ETIPSEIQVF	I	OASL
406	EVGEALKTVL	I	DMD
407	KLEDLEEQL	I	DMD
408	LKIQSIAL	I	DMD
409	MNVLTEWLAAT	I	DMD
410	AIQDKLFQV	I	CHCHD6
411	FPNFDKQEL	I	SMARCAD1
412	GQTKEVLVI	I	SMARCAD1
413	KLIESTSTM	I	SMARCAD1
414	KPYQKVGL	I	SMARCAD1
415	KQESIVLKL	I	SMARCAD1
416	NANNRLLL	I	SMARCAD1
417	SEVPNGKEV	I	SMARCAD1
418	TNNIGSIAR	I	PANK2
419	DAKGRTVSL	I	GPX8
420	IIKKKEDL	I	GPX8
421	DVIDVVQAL	I	C20orf194
422	EEFKITSF	I	C20orf194
423	SDFEKTGF	I	C20orf194
424	DEDRLLVVF	I	USP34
425	HHSNIPMSL	I	USP34
426	LFPSLIKNL	I	USP34
427	NTNIPIGNK	I	USP34
428	SDQVADLR	I	USP34
429	THFSFPLRL	I	USP34
430	TYDSVTDKF	I	USP34
431	AESLYEIRF	I	TM9SF1
432	DEFLGLTHTY	I	TM9SF1
547	IITEVITRL	I	MUC16
548	KMISAIPTL	I	MUC16
549	TYSEKTLF	I	MUC16

Таблица 4

Дополнительные пептиды, полезные
в терапии рака; X=S, R или G

SEQ ID No.	Последовательность	Класс МНС	Символ гена
433	ALDFFGNGPPVNY	II	IFI30
434	ALDFFGNGPPVNYKT	II	IFI30
435	DFFGNGPPVNYK	II	IFI30
436	DFFGNGPPVNYKT	II	IFI30
437	DFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30
438	DFFGNGPPVNYKTGNL	II	IFI30
439	DFFGNGPPVNYKTGNLY	II	IFI30
440	LQALDFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30
441	QALDFFGNGPPVNYK	II	IFI30
442	QPPHEYVPWVTVNGKP	II	IFI30
443	SPLQALDFFGNGPPVNYKTG	II	IFI30
444	SPLQALDFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30
445	SPLQALDFFGNGPPVNYKTGNLY	II	IFI30
446	GPPFSSSQSIPVVR	II	GPR64
447	LPSSLMNNLPAHDM	II	GPR64
448	LPSSLMNNLPAHDME	II	GPR64
449	LPSSLMNNLPAHDMEL	II	GPR64
450	SPIGEIQPLSPQPSAPI	II	GPR64
451	DEVTPPFVIDEKTAEIR	II	PCDHB5
452	KYPELVLDKALDREER	II	PCDHB5
453	KYPELVLDKALDREERPE	II	PCDHB5
454	VTQPFVIDEKTAEIR	II	PCDHB5
455	DGRTIVDLEGTVPVSPD	II	FNDC1
456	DGRTIVDLEGTVPVSPDG	II	FNDC1
457	DKPILSLGGKPLVG	II	FNDC1
458	GDGRTIVDLEGTVPVSPD	II	FNDC1
459	GDGRTIVDLEGTVPVSPDG	II	FNDC1
460	GGDGRTIVDLEGTVPVSPD	II	FNDC1
461	GGDGRTIVDLEGTVPVSPDG	II	FNDC1
462	GRTIVDLEGTVPVSPD	II	FNDC1
463	KVKEYILSYAPALKPF	II	FNDC1
464	KVKEYILSYAPALKPFG	II	FNDC1
465	LGGDGRTIVDLEGTVPVSPDG	II	FNDC1
466	RTHEIKKLASESVYV	II	FNDC1
467	VKEYILSYAPALKPF	II	FNDC1
468	YSKTQYNQVPSEDFERTPQ	II	CXADR
469	AAPNLSRMGAIPVMIP	II	CXADR
470	AAPNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR
471	APNLSRMGAIPVMIP	II	CXADR
472	APNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR
473	GYSKTQYNQVPSEDFERTPQ	II	CXADR
474	SKTQYNQVPSEDFER	II	CXADR
475	SKTQYNQVPSEDFERTP	II	CXADR
476	SKTQYNQVPSEDFERTPQ	II	CXADR
477	VAAPNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR
478	VIILYSGDKIYD	II	CXADR
479	YSKTQYNQVPSEDFER	II	CXADR
480	GHLFALRSLDYE	II	PCDHB3
481	AAEPGYLVTKVVAVDG	II	PCDHB3
482	AAEPGYLVTKVVAVDGD	II	PCDHB3
483	AAEPGYLVTKVVAVDGDS	II	PCDHB3
484	AAEPGYLVTKVVAVDGDSG	II	PCDHB3
485	AEFGYLVTKVVAVDG	II	PCDHB3

486	AEPGYLVTKVVAVDGD	II	PCDHB3
487	AEPGYLVTKVVAVDGDS	II	PCDHB3
488	EPGYLVTKVVAVDG	II	PCDHB3
489	EPGYLVTKVVAVDGD	II	PCDHB3
490	EPGYLVTKVVAVDGDS	II	PCDHB3
491	AEPGYLVTKVVAVD	II	PCDHB3
492	ADSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
493	ADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
494	DADSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
495	DADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
496	DADSTEFRPNAPVPLVIDM	II	CTPS2
497	DADSTEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2
498	DADSTEFRPNAPVPLVIDMPE	II	CTPS2
499	DSTEFRPNAPVPL	II	CTPS2
500	DSTEFRPNAPVPLV	II	CTPS2
501	DSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
502	DSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
503	DSTEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2
504	DSTEFRPNAPVPLVIDMPE	II	CTPS2
505	KDADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
506	STEFRPNAPVPL	II	CTPS2
507	STEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
508	STEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
509	STEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2
510	AGDYTIANARKLIDE	II	RP2
511	ETLERLQEL		DMD
512	ADITYAIEADSESVK	II	FAT1
513	DITYAIEADSESVK	II	FAT1
514	KRDNYQIKVVASDHGE	II	FAT1
515	KRDNYQIKVVASDHGEK	II	FAT1
516	RDESFVIDRQSGRLK	II	FAT1
517	RDNYQIKVVASDHGE	II	FAT1
518	SPSELDROPAYAVT	II	FAT1
519	TPPQFSSVKVIHVTSPQ	II	FAT1
520	VPLPDIQEFPNY	II	FAT1
521	GPQLFHMDPSGTFVQ	II	PSMA5
522	DKNYFEGTGYARVPTQP	II	LAMA3
523	DKNYFEGTGYARVPTQPH	II	LAMA3
524	DSKPLYTPSSSFGVS	II	LAMA3
525	IQRQVKEINSLQSDFT	II	LAMA3
526	KNYFEGTGYARVPT	II	LAMA3
527	KNYFEGTGYARVPTQP	II	LAMA3
528	KNYFEGTGYARVPTQPH	II	LAMA3
529	SPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
530	SPRVVPNESIPIIPD	II	PTPRG
531	SSPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
532	SSPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
533	SSPRVVPNESIPIIPD	II	PTPRG
534	DDKGYTLMHPSLTRPY	II	CACHD1
535	DVGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
536	GAGYVVTISHTIH	II	CACHD1
537	GAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
538	GGAGYVVTISHTIH	II	CACHD1
539	GGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
540	VGGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
541	MTRTFHDLEGNVAVKRDSG	II	ERMP1
542	RTFHDLEGNVAVKR	II	ERMP1
543	RTFHDLEGNVAVKRDSG	II	ERMP1
544	SGTFFPYSSNPANPK	II	ERMP1
545	SGTFFPYSSNPANPKP	II	ERMP1
546	TRTFHDLEGNVAVKR	II	ERMP1

Настоящее изобретение далее в основном относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении пролиферативных заболеваний, например рака яичника, немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака почек, рака головного мозга, рака толстой или прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкоза, рака молочной железы, карциномы клеток Меркеля, меланомы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря, рака желчных протоков и других опухолей, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 319.

Особенно предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - в соответствии с настоящим изобретением, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549. Более предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 319 (см. табл. 1 и 2) и их применение в иммунотерапии рака яичников, немелкоклеточного

рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака почек, рака головного мозга, рака толстой или прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоза, рака молочной железы, карциномы клеток Меркеля, меланомы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря, рака желчных протоков и, предпочтительно, рака яичника.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для - предпочтительно комбинированного - лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы: рак яичника, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак почек, рак головного мозга, рак толстой или прямой кишки, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, карцинома клеток Меркеля (ККМ), меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и рак желчных протоков.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанные пептиды (каждый из них) состоят или состоят по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности слитого с N-терминальными аминокислотами HLA-DR антиген-ассоциированной инвариантной цепи (II), или слитого с антителом (или встроенный в последовательность), таким как, например, антителом, специфичным для дендритных клеток.

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

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному к экспрессии и/или экспрессирующему нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением.

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

Настоящее изобретение далее относится к антителам, которые являются специфическими по отношению к пептидам в соответствии с настоящим изобретением или комплексам указанных пептидов в соответствии с настоящим изобретением и МНС и способам их получения.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 319 или его вариантную аминокислотную последовательность.

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

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи

клетки-мишени абберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, полученных в соответствии с настоящим изобретением.

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

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

Настоящее изобретение относится далее к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные клетки рака являются клетками рака яичника, мелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака почек, рака головного мозга, рака толстой или прямой кишки, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкоза, рака молочной железы, карциномы клеток Меркеля, меланомы, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и рака желчных протоков и предпочтительно рака яичника.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые "мишенями", которые могут быть использованы при постановке диагноза рака, предпочтительно рака яичника. В роли маркера может выступать избыточная презентация самого(их) пептида(ов) или избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии и наиболее предпочтительно иммунотерапии, направленной на ту же мишень, которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР.

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

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

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

Подробное описание изобретения

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности слитого с N-терминальными аминокислотами HLA-DR антиген-ассоциированной инвариантной цепи (II) или слитого с антителом (или встроенный в последовательность), таким как, например, антителом, специфичным к дендритным клеткам, т.е. связывающимся с дендритными клетками.

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

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному экспрессировать, экспрессирующему и/или презентующему нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответст-

вии с настоящим изобретением для применения в медицине.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу получения активированных Т-клеток *in vitro*, причем способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами человеческого МНС I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки в течение периода времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом указанных Т-клеток, где указанный антиген является по меньшей мере одним пептидом в соответствии с настоящим изобретением.

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549 или вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению любого описанного пептида, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, клетки в соответствии с настоящим изобретением или активированной Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением в качестве медикамента или в производстве медикамента.

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза течения рака яичника.

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

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

Стимуляция иммунных ответов зависит от присутствия антигенов, распознаваемых иммунной системой хозяина как чужеродные. Открытие существования опухлеассоциированных антигенов повысило

возможность использования иммунной системы хозяина для вмешательства в рост опухоли. Различные механизмы управления обеими ветвями иммунной системы, как гуморальной, так и клеточной, исследуются в настоящее время для иммунотерапии рака.

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

Колоссальный прогресс в области иммунотерапии рака в течение последних лет привел к ее широкому признанию в качестве дополнения с потенциальным лечебным эффектом или альтернативы стандартных химиотерапевтических подходов. В нескольких работах продемонстрирована значимость презентлируемых молекулами HLA опухолеассоциированных антигенов с мутациями или дикого типа в качестве ценных антигенов отторжения опухоли. Поэтому широкомасштабная идентификация презентлируемых молекулами HLA опухолевых антигенов, специфических для рака, вносит еще один важный элемент в мозаику нашего понимания того, как иммунная система идентифицирует и распознает опухолевые клетки.

В настоящем изобретении внимание авторов сфокусировано на эпителиальном раке яичника (ЭРЯ) с целью исчерпывающей характеристики иммунопептидома ЭРЯ и оценки HLA-презентлируемых антигенов в отношении их пригодности в клиническом применении. До сих пор для ЭРЯ было идентифицировано лишь небольшое количество презентлируемых молекулами HLA антигенов, и большинство клинических исследований основывалось на предсказанных или широко известных раково-тестикулярных антигенах, которые необязательно имеют также частую презентацию при ЭРЯ - факт, подтвержденный анализом, проведенным авторами изобретения.

Наряду с ранее опубликованной информацией авторы изобретения демонстрируют постоянные и высокие уровни экспрессии молекул HLA I класса на клетках опухоли яичника. Кроме того, авторы изобретения демонстрируют на уровне отдельной клетки, что при ЭРЯ наблюдается сильная экспрессия молекул HLA-DR. Эта сильная экспрессия далее легла в основу проведенной авторами изобретения идентификации больших количеств лигандов МНС II класса, выделенных из опухолей яичника, а также из высоко обогащенных фракций опухолевых клеток.

Создание профилей иммунопептидома 34 опухолей яичника в сравнении более чем с 85 источниками доброкачественных клеток различного происхождения позволило выявить несколько сотен антигенов, ассоциированных с ЭРЯ. Среди группы TOP 100 (100 элементов с наивысшим рангом) антигенов ЭРЯ HLA I класса, не презентлируемых ни на одной из тканей банка данных доброкачественных тканей, имеющегося в распоряжении авторов изобретения, самым исключительным был MUC16. Принимая во внимание как число идентифицированных HLA-лигандов (>80), так и частоту встречаемости в когорте пациентов (~80%), этот результат является беспрецедентным, не применимым ни к какому другому опухолевому антигену и виду опухоли, исследованным авторами изобретения до сих пор. Более того, авторы изобретения смогли установить, что более 70% HLA-лигандов, полученных из MUC16, являются иммуногенными и способны к праймингу Т-клеток у здоровых индивидов, делая муцин 16 первоклассным антигеном для иммунотерапии ЭРЯ, не имеющим аналогов. Изучение профиля иммунопептидома также дает наглядную картину проникновения в суть очевидных механизмов ЭРЯ, которые отражены в лигандах HLA как в случае лигандов HLA I класса, так и II класса. HLA-лиганды важных киназ и фосфатаз (DDR1, EYA2), транскрипционных факторов (SOX9, SOX17), белков, ассоциированных с подавлением иммунной системы (IDO1, галектин 1), а также известных и предполагаемых молекулярных маркеров ЭРЯ (MUC1, CLK10, FOLR1) - это лишь немногие примеры, заслуживающие упоминания. Примечательно, что для молекул HLA II класса мезотелин, известный лиганд MUC16, был идентифицирован как опухолеассоциированный антиген, занимающий первое место рейтинга. В нескольких исследованиях была продемонстрирована ведущая роль оси MUC16/MSLN в клеточной инвазии и метастазировании при ЭРЯ, а также при других опухолях, таких как рак поджелудочной железы или мезотелиома, позволяя предположить, что эпитопы Т-клеток этих антигенов должны пройти дальнейшие испытания при других злокачественных заболеваниях. Авторы изобретения смогли продемонстрировать, что окрашивание MSLN напрямую коррелирует с окрашиванием MUC16, и высокий уровень экспрессии MSLN представляет собой отрицательный прогностический фактор при ЭРЯ.

Впервые для этого вида исследования составления профиля иммунопептидома использовались несколько различных доброкачественных тканей и видов клеток (МКПК, костный мозг, печень, почки, толстая кишка, яичник). В связи с ограничениями по количеству различных тканей, доступных для исследования, авторы изобретения не могли полностью исключить, что отдельные антигены, возможно, также презентруются молекулами HLA в других органах. Установленная функциональная значимость этих антигенов для ЭРЯ и, в частности, иммуногенность соответствующих пептидов у здоровых индивидов,

тем не менее, делает презентацию этих антигенов в других тканях маловероятной.

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

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

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

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

Понятие "пептиды настоящего изобретения" включает также пептиды, состоящие из или включающие пептид, как определено выше в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549.

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

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

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

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

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

Таблица 5

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
A*02	Европеоидная раса (Северная Америка)	49,1%
A*02	Афроамериканцы (Северная Америка)	34,1%
A*02	Монголоиды (Северная Америка)	43,2%
A*02	Латиноамериканцы (Северная Америка)	48,3%
DR1	Европеоидная раса (Северная Америка)	19,4%
DR2	Европеоидная раса (Северная Америка)	28,2%
DR3	Европеоидная раса (Северная Америка)	20,6%
DR4	Европеоидная раса (Северная Америка)	30,7%
DR5	Европеоидная раса (Северная Америка)	23,3%
DR6	Европеоидная раса (Северная Америка)	26,7%
DR7	Европеоидная раса (Северная Америка)	24,8%
DR8	Европеоидная раса (Северная Америка)	5,7%
DR9	Европеоидная раса (Северная Америка)	2,1%
DR1	Афроамериканцы (Северная Америка)	13,20%
DR2	Афроамериканцы (Северная Америка)	29,80%
DR3	Афроамериканцы (Северная Америка)	24,80%
DR4	Афроамериканцы (Северная Америка)	11,10%
DR5	Афроамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR6	Афроамериканцы (Северная Америка)	33,70%
DR7	Афроамериканцы (Северная Америка)	19,20%
DR8	Афроамериканцы (Северная Америка)	12,10%
DR9	Афроамериканцы (Северная Америка)	5,80%
DR1	Монголоиды (Северная Америка)	6,80%
DR2	Монголоиды (Северная Америка)	33,80%
DR3	Монголоиды (Северная Америка)	9,20%
DR4	Монголоиды (Северная Америка)	28,60%
DR5	Монголоиды (Северная Америка)	30,00%
DR6	Монголоиды (Северная Америка)	25,10%
DR7	Монголоиды (Северная Америка)	13,40%
DR8	Монголоиды (Северная Америка)	12,70%
DR9	Монголоиды (Северная Америка)	18,60%
DR1	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,30%
DR2	Латиноамериканцы (Северная Америка)	21,20%
DR3	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,20%
DR4	Латиноамериканцы (Северная Америка)	36,80%
DR5	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,00%
DR6	Латиноамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR7	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,20%
DR8	Латиноамериканцы (Северная Америка)	18,60%
DR9	Латиноамериканцы (Северная Америка)	2,10%
A*24	Филиппины	65%
A*24	Русские ненцы	61%
A*24:02	Япония	59%
A*24	Малайзия	58%
A*24:02	Филиппины	54%
A*24	Индия	47%
A*24	Южная Корея	40%
A*24	Шри-Ланка	37%
A*24	Китай	32%
A*24:02	Индия	29%
A*24	Западная Австралия	22%
A*24	США	22%
A*24	Россия, Самара	20%
A*24	Южная Америка	20%
A*24	Европа	18%

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

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

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

ляторные элементы, образованные из микробного или вирусного оперона.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Нуклеиновые кислоты и полипептиды как продукты экспрессии, раскрываемые в соответствии с настоящим изобретением, в равной степени, как и векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или такие полипептиды, могут быть в "обогащенной форме". Используемый здесь термин "обогащенный" означает, что концентрация материала по меньшей мере приблизительно в 2, 5, 10, 100

или 1000 раз выше его естественной концентрации (например), преимущественно 0,01%, по массе, предпочтительно по меньшей мере около 0,1% по массе. Рассматриваются также обогащенные препараты с концентрацией примерно 0,5, 1, 5, 10 и 20% по массе. Последовательности, конструкции, векторы, клоны и другие материалы, включенные в настоящее изобретение, могут быть предпочтительно в обогащенной форме или выделенными.

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

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

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

где "C" является числом различий между контрольной последовательностью и сравниваемой последовательностью по длине выравнивания между контрольной последовательностью и сравниваемой последовательностью, где:

- (i) каждое основание или аминокислота в контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего выровненного основания или аминокислоты в сравниваемой последовательности; и
- (ii) каждая брешь в контрольной последовательности; и
- (iii) каждое выровненное основание или аминокислота в контрольной последовательности, которые отличаются от выровненного основания или аминокислоты в сравниваемой последовательности, представляют собой различие; и
- (iiii) выравнивание должно начинаться с позиции 1 выровненных последовательностей; и

"R" - это число оснований или аминокислот в контрольной последовательности по длине выравнивания со сравниваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

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

Как было упомянуто выше, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549 или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или - удлиненные версии упомянутых пептидов - с МНС II класса.

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

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

Под "вариантом" данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с

SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы МНС, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист в данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохраняют ли такие варианты способность связываться с молекулами МНС I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

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

Консервативные замены определены в контексте настоящего описания как обмены внутри одной из последующих пяти групп:

- группа 1 - малые, алифатические, неполярные или слабополярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly);
- группа 2 - полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln);
- группа 3 - полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys);
- группа 4 - крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys);
- группа 5 - крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина остатком изолейцина. Высоконеконсервативные замены могут охватывать замену кислой аминокислоты полярной или даже такой, которая имеет основной характер. Такие "радикальные" замены не могут, однако, быть отвергнуты как потенциально неэффективные из-за того, что химические эффекты не полностью предсказуемы, и радикальные замены могут неожиданно привести к благоприятным эффектам, не предсказуемым исходя из обычных химических принципов.

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

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

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

или II класса не будет существенно изменена или подвергнута негативному влиянию по сравнению с немодифицированным пептидом.

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

Более длинные (удлиненные) пептиды также могут быть пригодными. Возможно, чтобы эпитопы, связывающиеся с молекулами МНС I класса, хотя они обычно имеют длину между 8 и 11 аминокислотами, были получены при процессинге пептидов из более длинных пептидов или белков, включающих истинный эпитоп. Предпочтительно, чтобы остатки, которые примыкают к истинному эпитопу, существенно не влияли на протеолитическое расщепление, необходимое для презентации истинного эпитопа во время процессинга.

Пептиды по изобретению могут быть удлинены с помощью вплоть до четырех аминокислот, это значит, что 1, 2, 3 или 4 аминокислоты могут быть добавлены к одному из концов в любой комбинации, представленной между 4:0 и 0:4. Комбинации элонгаций в соответствии с изобретением могут быть взяты из табл. 6.

Таблица 6

Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

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

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

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

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549.

"Состоит по существу из" подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, или его вариант содержит

дополнительные находящиеся на N- и/или C-конце фрагменты последовательности аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для молекул МНС.

Тем не менее эти фрагменты могут быть важны для обеспечения эффективного введения пептида в соответствии с настоящим изобретением в клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид является частью слитого белка, которая включает, например, 80 N-терминальных аминокислот антиген-ассоциированной инвариантной цепи (р33, в дальнейшем "Ii") HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела так, чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфичным для дендритных клеток, описанных в настоящем документе.

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

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

Непептидной связью является, например, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-. В патенте США № 4897445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей (-CH₂-NH) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции аминокислоты в присутствии NaCNBH₃.

Пептиды, включающие последовательности, описанные выше, могут быть синтезированы с дополнительными химическими группами, находящимися на их аминном и/или карбоксильном концах, для увеличения стабильности, биологической доступности и/или аффинности пептидов. Например, гидрофобные группы, такие как карбобензоксильные, данзилльные или трет-бутилоксикарбонильные группы, могут быть добавлены к аминным концам пептидов. Подобным образом, ацетильная группа или 9-флуоренилметокси-карбонильная группа может быть размещена на аминных концах пептидов. Кроме того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа могут быть добавлены к карбоксильным концам пептидов.

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

Подобным образом, пептид или вариант по изобретению может быть модифицирован химическим способом посредством реакции отдельных аминокислот как до, так и после синтеза пептида. Примеры таких модификаций хорошо известны из уровня техники и обобщаются, например, в работе R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), которая включена в описание по ссылке. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксирования лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидную модификацию карбоксильных групп и сульфгидрильную модификацию с помощью окисления надмуравьиной кислотой цистеина до цистеиновой кислоты, образование производных ртути, образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями, реакцию с малеимидом, карбоксиметилирование йодоуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирование цианатом при щелочном уровне pH, хотя не ограничиваясь ими. В этой связи специалист в данной области может проконсультироваться с главой 15 в работе *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Hassan и соавт. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) для получения более обширной информации о методах, связанных с химической модификацией белков.

Вкратце, модификация, например, аргинильных остатков в белках часто основана на реакции вицинальных дикарбонильных соединений, таких как фенилглиоксаль, 2,3-бутандион и 1,2-циклогександион, с образованием аддукта. Другим примером является реакция метилглиоксаля с остатками аргинина. Цис-

теин может быть модифицирован без сопутствующей модификации других нуклеофильных сайтов, таких как лизин и гистидин. В результате для модификации цистеина доступно большое число реагентов. Веб-сайты компаний, таких как Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>), предоставляют информацию по конкретным реагентам.

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств. К-реагент Вудворда может использоваться для модификации определенных остатков глутаминовой кислоты. N-(3-(Диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты. Например, диэтилпирикарбонат является реагентом для модификации гистидильных остатков в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-ноненаля. Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения полиэтиленгликоля и основным сайтом модификации при гликозилировании белков. Остатки метионина в белках могут быть модифицированы, например, с помощью йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина Т.

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

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

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

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высокощелочлабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N,N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамин (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется не стойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных, за исключением аспарагина и глютамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N,N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксибензотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50% смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

Очистка может быть произведена любой методикой или комбинацией таких методик, как перекристаллизация, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография гидрофобно-

го взаимодействия и (обычно) обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с использованием, к примеру, градиентного разделения в системе ацетонитрил/вода.

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

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

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

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

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

Комплексы HLA-пептид из образцов опухолевой ткани рака яичника были очищены, и HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС (см. примеры). Все TUMAP, содержащиеся в настоящем документе, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах первичного рака яичника, что подтверждает их презентацию на клетках первичного рака яичника.

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

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

Многие из исходных генов/белков (называемых также "белками полной длины" или "базовыми белками"), из которых были получены пептиды, были в высокой степени избыточно экспрессированы в клетках рака по сравнению с нормальными тканями - понятие "нормальные ткани" в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки ткани яичника или другие нормальные клетки ткани, демонстрирующие высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью. Более того, сами пептиды в

высшей степени избыточно презентирются на опухолевой ткани - понятие "опухолевая ткань" в связи с настоящим изобретением подразумевает образец ткани пациента, страдающего раком яичника, но не на нормальных тканях.

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

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентирются и поэтому могут использоваться для получения антител и/или ТКР, таких как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках. Таким образом, пептиды по настоящему изобретению пригодны для генерирования иммунного ответа в организме пациента для уничтожения опухолевых клеток. Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т.е. адъювантом). Можно ожидать, что иммунный ответ, вызванный такой терапевтической вакцинацией, будет высокоспецифично направлен против опухолевых клеток, так как целевые пептиды по настоящему изобретению не презентирются на нормальных тканях в сравнимом количестве копий, предотвращая, тем самым, риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

Настоящее описание далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), включающим альфа-цепь и бета-цепь ("альфа/бета-ТКР"). Также предложены пептиды HAVCR1-001, способные связываться с ТКР и антителами, если они презентирются молекулой МНС. Настоящее описание также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам для экспрессии ТКР и пептидам по настоящему изобретению и методам их применения.

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

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

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

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

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

ТКР по настоящему изобретению предпочтительно связываются с комплексом пептида-молекула HLA по изобретению с аффинностью связывания (KD) около 100 мкМ или ниже, около 50 мкМ или ниже, около 25 мкМ или ниже или около 10 мкМ или ниже. Более предпочтительными являются высокоаффинные ТКР с аффинностью связывания, составляющей около 1 мкМ или ниже, около 100 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже. Неограничивающие примеры диапазонов предпочтительной аффинности связывания для ТКР по настоящему изобретению включают значения от около 1 до около 10 нМ; от около 10 до около 20 нМ; от около 20 до около 30 нМ; от около 30 до около 40 нМ;

от около 40 до около 50 нМ; от около 50 до около 60 нМ; от около 60 до около 70 нМ; от около 70 до около 80 нМ; от около 80 до около 90 нМ и от около 90 до около 100 нМ.

Понятие "специфическое связывание", используемое в связи с понятием ТКР по настоящему изобретению, и его грамматические варианты используются для обозначения ТКР с аффинностью связывания (KD) для комплекса пептида HAVCR1-001 и молекулы HLA 100 мкМ или ниже.

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

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

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

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

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

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

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

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

В другом аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, РНК ТКР синтезируют с помощью методик, известных из уровня техники, например транскрипционные системы *in vitro*. Синтезированные *in vitro* РНК ТКР затем вводят с помощью электропорации в первичные CD8⁺ Т-клетки, полученные у здоровых доноров, в целях повторной экспрессии альфа- и/или бета-цепей опухолеспецифических ТКР.

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

В дополнение к сильным промоторам, экспрессионные кассеты ТКР согласно настоящему описанию могут содержать дополнительные элементы, которые могут усиливать экспрессию трансгена, включая центральный полипуриновый тракт (сРРТ), который способствует ядерной транслокации лентивирусных конструкций (Follenzi et al., 2000), и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (wPRE), который повышает уровень экспрессии трансгена за счет увеличения стабильности РНК (Zufferey et al., 1999).

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

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

Нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть кодон-оптимизированы для увеличения экспрессии клеткой-хозяином. Избыточность генетического кода позволяет кодирование некоторых аминокислот более чем одним кодоном, однако некоторые конкретные кодоны менее "оптимальны", чем другие, по причине относительной доступности подходящих тРНК, а также других факторов (Gustafsson и соавт., 2004). Как было показано, модификации последовательностей генов ТКР-альфа и ТКР-бета, так чтобы каждая аминокислота кодировалась оптимальным кодоном для экспрессии генов млекопитающих, а также удаление нестабильных мотивов мРНК или криптических сайтов сплайсинга существенно усиливали экспрессию генов ТКР-альфа и ТКР-бета (Scholten и соавт., 2006).

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

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными эквивалентами (С-концевой "муринизированный" домен); получение второй межцепочечной дисульфидной связи в С-концевом домене за счет введения второго остатка цистеина в обе цепи: ТКР-альфа и ТКР-бета введенного ТКР (модификация цистеином); обмен взаимодействующими остатками в С-концевом домене ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей ("выступ-во-впадину") и слияние вариабельных доменов цепей ТКР-альфа и ТКР-бета непосредственно в CD3 ζ (слияние CD3 ζ). (Schmitt et al. 2009).

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

"Фармацевтическая композиция" является композицией, подходящей для введения человеку в рам-

ках лечения. Предпочтительно, если фармацевтическая композиция является стерильной и произведена в соответствии с правилами GMP (надлежащей производственной практики).

Фармацевтические композиции включают пептиды как в свободной форме, так и в форме фармацевтически приемлемой соли (см. также выше). Используемое в контексте данного изобретения понятие "фармацевтически приемлемая соль" относится к производным раскрытых пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислых или основных солей вещества. Например, кислые соли получают из свободного основания (как правило, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу $-NH_2$) с применением реакции с подходящей кислотой. Подходящие кислоты для получения кислых солей включают как органические кислоты, например уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, *p*-толуолсульфокислоту, салициловую кислоту и подобные, так и неорганические кислоты, например соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобные. И наоборот, приготовление основных солей кислотных компонентов, которые могут присутствовать на пептиде, производится при использовании фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин и тому подобных.

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

Предпочтительно, если медикамент по настоящему изобретению является иммунотерапевтическим препаратом, таким как вакцина. Она может вводиться непосредственно пациенту, в пораженный орган или системно в/к, в/м, п/к, в/б и в/в или вноситься *ex vivo* в клетки, полученные от пациента, или в человеческую клеточную линию, которые затем могут вводиться пациенту или использоваться *in vitro* для селекции субпопуляции из иммунных клеток, полученных от пациента, которые после этого вновь вводятся пациенту. Если нуклеиновая кислота введена в клетки *in vitro*, то может быть полезно, чтобы клетки были трансфицированными, чтобы совместно экспрессировать иммуностимулирующие цитокины, такие как интерлейкин-2. Пептид может быть по существу чистым или в комбинации с иммуностимулирующим адъювантом (см. ниже), или использоваться в комбинации с иммуностимулирующими цитокинами, или же вводиться с подходящей системой доставки, например липосомами. Пептид может быть также конъюгирован с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. WO 95/18145 и (Longenecker et al., 1993)). Пептид может быть также меченым или может быть слитым белком или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем изобретении, как ожидается, стимулируют $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-клетки. Тем не менее стимуляция $CD8$ Т-клеток более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой $CD4$ хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов МНС I класса, которые стимулируют $CD8$ Т-клетки, партнеры в слиянии или участки гибридной молекулы надлежащим образом предоставляют эпитопы, которые стимулируют $CD4$ -положительные Т-клетки. $CD4$ - и $CD8$ -стимулирующие эпитопы хорошо известны из уровня техники и включают те, что были идентифицированы в настоящем изобретении.

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID No 549, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 2 до 25, еще более предпочтительно от 2 до 20 и наиболее предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 пептидов. Пептид(ы) может(гут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(гут) связываться с молекулами МНС I класса.

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

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

Синтетические линкеры, содержащие один или несколько сайтов рестрикции, обеспечивают альтернативный способ присоединения сегмента ДНК к векторам. Синтетические линкеры, содержащие ряд

сайтов распознавания рестрикционной эндонуклеазы, имеются в продаже в различных источниках, включая International Biotechnologies Inc, Нью-Хейвен, Коннектикут, США.

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

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящем хозяине для получения полипептида, включающего пептид или вариант по изобретению. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант по изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению. Такие методики включают те, что раскрыты, например, в патентах США № 4440859, 4530901, 4582800, 4677063, 4678751, 4704362, 4710463, 4757006, 4766075 и 4810648.

ДНК (или в случае ретровирусных векторов - РНК), кодирующая полипептид, представляющий собой соединение по изобретению, может быть присоединена к обширному ряду других последовательностей ДНК для введения в соответствующего хозяина. ДНК-спутник будет зависеть от природы хозяина, способа введения ДНК хозяину и от того, желательно ли поддержание в эписомальной или интеграционной форме.

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

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

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

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

Типичная клеточная векторная плазмид млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомицин. Одним примером является pSVL, имеющийся в наличии в компании Pharmacia, Пискатеуэй, Нью-Джерси, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, также имеющийся в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии у компании Stratagene Cloning Systems, Ла Джолла, Калифорния 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (Ylps) и включают дрожжевые селективируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми плазмидами с центромерами (Ycp). Основанные на промоторе CMV векторы (например, компании Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазматическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, c-мус или MAT. Данные слитые белки позволяют проводить выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

Сильный регуляторный участок промотора цитомегаловируса человека (CMV) повышает уровни конститутивной экспрессии белка, достигающие 1 мг/л в клетках COS. Для менее активных клеточных линий белковые уровни обычно составляют ~0,1 мг/л. Присутствие точки начала репликации SV40 будет приводить к высоким уровням репликации ДНК в пермиссивных клетках COS. Векторы CMV, например, могут содержать точку начала репликации pMB1 (производное pBR322) в бактериальных клетках, ген бета-лактамазы для отбора устойчивости к ампициллину у бактерий, polyA гормона роста человека и точку начала репликации f1 Векторы, содержащие лидерную последовательность препротрипсина (PPT),

могут направлять секрецию слитых белков FLAG в культуральной среде для очистки с использованием антител к FLAG, смол и планшетов. Другие векторы и системы экспрессии для применения с различными клетками-хозяевами хорошо известны из уровня техники.

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

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

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

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

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

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

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

В другом варианте осуществления пептид, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии по изобретению применяются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внут-

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

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

Медикамент по изобретению может также включать один или более адъювантов. Адъюванты - это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками или хелперными Т-клетками (ТН)) на антиген и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте по настоящему изобретению. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, СуаА, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии "вода в масле" и "масло в воде", ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторную систему PepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстране микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонина, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъюванты, такие как Detox компании Ribi, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие, как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Grumel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотносены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5849589, специально включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антигенспецифичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа ТН1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация ТН1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации ТН2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на

полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6406705 B1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антигенспецифического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двухцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

Другие примеры пригодных к использованию адъювантов включают, но без ограничения, химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги dsРНК, такие как поли-(I:C) и их производные (например, AmpliGen®, Hiltonol®, поли-(ICLC), поли(IC-R), поли(I:C12U), бактериальные ДНК или РНК, отличные от CpG, а также иммуноактивные малые молекулы и антитела, такие как циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб®, целебрекс, NCX-4016, силденафил, тадалафил, варденафил, сорафениб, темозоломид, темсиролимус, XL-999, CP-547632, пазопаниб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4, другие антитела, нацеленные на основные структуры иммунной системы (например, антитела к CD40, TGF-бета, рецептору TNF-альфа) и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или как адъюванты. Количества и концентрации адъювантов и добавок, пригодных для использования в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены опытным специалистом без проведения излишних экспериментов.

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

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

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

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

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутривенное, внутримышечное, или для перорального введения. Для этого пептиды и, факультативно, другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены вместе с иммуностимулирующими агентами, такими как цитокины. Обширный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, может быть взят, например, из работы A. Kibbe, "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (Kibbe, 2000). Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и/или лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Примеры фармацевтических композиций могут быть взяты, например, из EP 2112253.

Важно понимать, что иммунный ответ, вызванный вакциной в соответствии с изобретением, направлен на раковые клетки на различных стадиях клеточного цикла и различных стадиях развития опухоли. Кроме того, атака направлена на различные сигнальные пути, ассоциированные с раковым заболеванием. Это является преимуществом в сравнении с вакцинами, направленными только на одну или немногие мишени, что может привести к тому, что опухоль легко приспособится к такой атаке (ускользание опухоли). Кроме того, не все отдельные опухоли имеют одинаковые паттерны экспрессии антигенов. Поэтому комбинация нескольких опухолеассоциированных пептидов гарантирует, что на каждой отдельной опухоли имеются по меньшей мере некоторые из этих мишеней. Композиция разработана исходя из того, что, как ожидается, каждая опухоль экспрессирует несколько антигенов и охватывает несколько независимых сигнальных путей, необходимых для роста и сохранения опухоли. Таким образом, вакцина в виде "готовой к применению" может быть легко использована для более крупной популяции пациентов. Это означает, что предварительный отбор пациентов для лечения вакциной может быть ограничен HLA-типированием, не требуя никакого дополнительного анализа биомаркеров экспрессии антигена, однако при этом остается гарантия одновременного воздействия на несколько мишеней в виде индуцированного иммунного ответа, что важно для эффективности (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

В контексте настоящего описания понятие "каркас" относится к молекуле, которая специфически связывается с (например, антигенной) детерминантой. В одном варианте осуществления каркас способен

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

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

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

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

Для получения дальнейшей информации о полипептидных каркасах см., например, раздел уровня техники патентной заявки WO 2014/071978 A1 и цитируемую в ней литературу.

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

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

Могут быть отобраны ДНК-аптамеры, проявляющие широкий спектр свойств по распознаванию различных раковых клеток и, в частности, клеток, образованных из солидных опухолей, тогда как неопухолевые и первичные здоровые клетки не распознаются. Если идентифицированные аптамеры распознают не только конкретный опухолевый подтип, но и взаимодействуют с различными опухолями, это делает возможным применение аптамеров в качестве так называемых диагностических и терапевтических средств широкого спектра действия.

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

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

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из по-

следовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, в соответствии с представленным изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

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

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

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

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

Предпочтительно, если антитело связывается с аффинностью связывания ниже 20 нМ, предпочтительно ниже 10 нМоль, с комплексом, который называется "специфическим" в контексте настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549 или их варианта, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, или его варианту, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30 и наиболее предпочтительно от 8 до 14 аминокислот.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, способным связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549.

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

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

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к не встречающемуся в природе пептиду, где указанный пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 48 и был получен синтетически (например, синтезирован) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов хорошо известны в данной области. Соли пептидов в соответствии с настоящим

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

Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высокощелочлабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N,N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глютаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонилла (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамина (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных, за исключением аспарагина и глютамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N,N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50% смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к

нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности в лечении рака яичника.

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

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

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

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

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

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

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры рака яичника полной длины, так и их фрагменты. Полипептид, необходимый для получения антитела по изобретению, может быть частично или полностью очищенным из природного источника или же может быть получен с использованием методики рекомбинантной ДНК.

Например, кДНК, кодирующая пептид в соответствии с настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549 или вариант или его фрагмент, может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, дрожжей, насекомых или клетках млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата из моноклональных или поликлональных антител,

которые специфически связываются с полипептидным маркером рака яичника, использованным для получения антитела по изобретению.

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

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное, по существу, из гомогенной популяции антител, т.е. отдельные антитела внутри популяции идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть представлены в небольших количествах. Моноклональные антитела в контексте настоящего изобретения специфически включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная(ые) часть(и) цепи идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, полученных из другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, в равной степени как и фрагментов таких антител, пока они проявляют желаемую антагонистическую активность (патент США № 4816567, который включен в настоящее описание в полном объеме).

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

Моноклональные антитела могут быть также получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК, таких как описываемые в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела по изобретению, может быть легко выделена и секвенирована с помощью стандартных методик (например, при использовании олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител).

In vitro-методы также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в особенности Fab-фрагментов, может быть произведено при использовании стандартных методик, известных из уровня техники. К примеру, расщепление может производиться при использовании папаина. Примеры расщепления под воздействием папаина описываются в заявке WO 94/29348 и в патенте США № 4342566. Расщепление антител под воздействием папаина обычно приводит к двум идентичным фрагментам, связывающимся с антигеном и называемым Fab-фрагментами, каждый из которых имеет отдельный антигенсвязывающий сайт и остаточный Fc-фрагмент. В результате обработки пепсином получается фрагмент F(ab')₂ и фрагмент pFc'.

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

Антитела по изобретению могут далее включать гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител - это химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab' или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющего комплементарности участка (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком

(донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающую способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированном CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по сути все по меньшей мере из одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина и все или по сути все из участков FR являются таковыми консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Способы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны из уровня техники. В целом, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотный остаток, введенный в него из источника, не являющегося человеческим. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются "импортированными" остатками, которые обычно берутся из "импортированного" переменного домена. Гуманизация может быть по существу произведена посредством замены участков CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (патент США № 4816567), где существенно меньшая часть, чем один интактный человеческий переменный домен, была заменена соответствующей последовательностью видов, не являющихся человеком. На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

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

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

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

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту в данной области. Специалистам в данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости, например, от субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых медикаментов. Типичная дневная дозировка антител, как монотерапии, может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения рака яичника, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту в данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака легкого в организме субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака легкого.

В другом аспекте изобретения предложен способ получения растворимого Т-клеточного рецептора (ТКР), распознающего конкретный комплекс пептида и МНС. Такие растворимые Т-клеточные рецепторы могут быть получены из специфических Т-клеточных клонов, и их аффинность может быть повышена за счет мутагенеза, направленного на определяющие комплементарности участки. Для выбора

Т-клеточного рецептора может использоваться фаговое отображение (заявка США 2010/0113300 (Liddy et al., 2012)). В целях стабилизации Т-клеточных рецепторов в процессе фагового отображения и в случае практического применения в качестве лекарственного средства альфа- и бета-цепи могут быть связаны, например, посредством не встречающихся в природе дисульфидных связей, других ковалентных связей (одноцепочечный Т-клеточный рецептор) или с помощью доменов димеризации (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). В целях выполнения определенных функций на клетках-мишенях Т-клеточный рецептор может быть связан с токсинами, лекарственными средствами, цитокинами (см., например, заявку США 2013/0115191), доменами, рекрутирующими эффекторные клетки, такими как анти-CD3 домен, и т.д. Более того, он может быть экспрессирован на Т-клетках, используемых для адоптивного переноса. Дополнительную информацию можно найти в патентных заявках WO 2004/033685 A1 и WO 2004/074322 A1. Комбинация растворимых ТКР описывается в патентной заявке WO 2012/056407 A1. Другие способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586 A1.

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

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

Антитела для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию; флюороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, флуоресцеин, родамин, эозин и другие флюорофоры, радиоизотопы, золото, гадолиний и другие лантаноиды, парамагнитное железо, фтор-18 и другие позитронно-активные радионуклиды. Более того, зонды могут быть би- или мультифункциональными и обнаруживаться более чем одним из приведенных способов. Данные антитела могут быть помечены напрямую или опосредованно указанными зондами. Присоединение зондов к антителам включает ковалентное присоединение зонда, внедрение зонда в антитело и ковалентное присоединение хелатирующего соединения для присоединения зонда, среди других широко признанных методов в данной области. Для иммуногистохимических исследований образец пораженной ткани может быть свежим или замороженным или может быть залит парафином и зафиксирован таким консервантом, как формалин. Зафиксированный или залитый срез приводят в контакт с помеченным первичным антителом и вторичным антителом, где антитело используется для обнаружения экспрессии белков *in situ*.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ получения активированных Т-клеток *in vitro*, причем способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации антигенспецифическим образом Т-клетки, где антиген является пептидом в соответствии с изобретением. Предпочтительно, если с антигенпрезентирующей клеткой применяется достаточное количество антигена.

Предпочтительно, если в клетке млекопитающих не имеется пептидного транспортера TAP или имеется его пониженный уровень или пониженная функциональная активность. Подходящие клетки с дефицитом пептидного транспортера TAP, включают T2, RMA-S и клетки дрозиды. TAP - это транспортер, связанный с процессингом антигена.

Линия человеческих клеток с недостаточностью T2, на которые загружаются пептиды, имеется в наличии в Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталожным номером CRL 1992; клеточная линия дрозиды, линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталожным номером CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается в работе Ljunggren и соавт. (Ljunggren and Kärre, 1985).

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

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

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549 или вариант такой аминокислотной последовательности.

Для получения Т-клеток *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, для получения ЦТЛ используются аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты. Plebanski и соавт.

(Plebanski et al., 1995) для получения Т-клеток использовали аутологичные лимфоциты периферической крови (ЛПК). Кроме того, возможно получение аутологичных Т-клеток посредством нагрузки дендритных клеток пептидом или полипептидом или посредством инфицирования рекомбинантным вирусом. Для получения аутологичных Т-клеток также можно использовать В-клетки. Кроме того, для получения аутологичных Т-клеток могут быть использованы макрофаги, нагруженные пептидом или полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. S. Walter и соавт. (Walter et al., 2003) описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), что является также подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. В настоящем изобретении иАПК были получены прикреплением предварительно образованных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микросфер) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоавидные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид, иАПК должны нести другие белки с стимуляторной активностью, такие как антигены к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система часто требует добавления соответствующих растворимых факторов, к примеру цитокинов, таких как интерлейкин-12.

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

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая aberrантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 549.

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

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

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

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

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

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

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

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

Поскольку полипептиды, лежащие в основе пептидов по изобретению, приведенные выше в таблицах, в высокой степени экспрессируются при раке яичника и экспрессируются на достаточно низком или крайне низком уровне в нормальных клетках, использование целевых пептидов, полученных из белковых продуктов следующих генов, может быть предпочтительно интегрировано в терапевтическую стратегию.

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

В настоящем изобретении также предложен комплект, включающий:

(а) контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, как описана выше, в виде раствора или в лиофилизированной форме;

(б) факультативно, второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава; и

(в) факультативно, инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению раствора и/или по применению лиофилизированного состава.

Кроме того, комплект может также включать один или более (iii) буферов, (iv) разбавителей, (v) фильтров, (vi) игл или (vii) шприцев. Контейнер является предпочтительно бутылкой, флаконом, шприцем или пробиркой; и он может быть контейнером многоразового применения. Фармацевтическая композиция предпочтительно является лиофилизированной.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В контексте настоящего изобретения термин "хранилище" относится к группе или набору пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в конкретном виде опухоли. Понятие "хранилище" не подразумевает, что конкретные пептиды, включенные в вакцину, были изготовлены заблаговременно и хранились в реальном помещении, хотя эта возможность также принимается во внимание. Во внимание определенно принимается тот факт, что пептиды могут быть изготовлены de novo для каждой производимой индивидуализированной вакцины или могут быть получены заранее и находиться на хранении. Хранилище (например, в форме банка данных) состоит из опухолеассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались в опухолевой ткани пациентов с раком яичника с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами МНС I класса и МНС II класса, или удлиненные пептиды, связанные с молекулами МНС I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей рака яичника, хранилище может содержать маркерные пептиды, связанные с HLA-A*02 и HLA-A*24, а также с другими, присутствующими в меньшем количестве, типами молекул HLA. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов положительного контроля, полученных "не из собственного" антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из "собственных" антигенов.

И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

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

1. HLA-лиганды из злокачественного материала идентифицировали с помощью масс-спектрометрии.
2. Для идентификации экспрессированных в избытке генов в злокачественной ткани (рак яичника) по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома.
3. Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, презентуемые в избытке или селективно презентуемые на опухолевой ткани, предпочтительно кодируемые селективно экспрессированными или экспрессированными в избытке генами, выявленными на этапе 2, считали подходящими TUMAP-кандидатами для мультипептидной вакцины.

4. Было произведено изучение литературы для выявления дополнительных свидетельств, подтверждающих релевантность идентифицированных в качестве TUMAP пептидов.

5. Релевантность избыточной экспрессии на уровне мРНК подтверждали повторным обнаружением выбранных на этапе 3 пептидов TUMAP на опухолевой ткани и отсутствием (или нечастым обнаружением) на здоровых тканях.

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

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

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

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

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

Предпочтительно, чтобы пептиды, включенные в вакцину, были идентифицированы способом, включающим (а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом отдельного пациента; (б) сравнение идентифицированных на этапе (а) пептидов с хранилищем (банком данных) пептидов, как описано выше; и (в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища (банка данных), который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента. Например, пептиды TUMAP, презентруемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или aberrантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или aberrантно экспрессируемых опухолью. Предпочтительно, если последовательности лигандов МНС идентифицируются с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов. Предпочтительно, если опухолевый образец и нормальная ткань получены от одного и того же пациента.

Помимо этого или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием модели хранилища (банка данных) пептиды TUMAP могут быть идентифицированы у пациента *de novo* и затем быть включены в вакцину. В качестве одного примера пептиды-кандидаты TUMAP могут быть идентифицированы у пациента с помощью (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или aberrантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или aberrантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соответствующей нормальной ткани отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную, не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белков

участков (повторное секвенирование экзона). В этих целях экзонную ДНК из человеческих образцов фиксируют с помощью поставляемых изготовителем наборов для обогащения целевыми фрагментами, за чем следует секвенирование, например, с помощью системы HiSeq2000 (Illumina). В дополнение к этому, опухолевую мРНК секвенируют для прямого количественного определения генной экспрессии и подтверждения того, что мутировавшие гены экспрессированы в опухолях пациентов. Считывание полученных в результате миллионов последовательностей осуществляется алгоритмами программного обеспечения. Получаемый список содержит мутации и экспрессию генов. Опухолеспецифические соматические мутации определяют сравнением с вариантами зародышевой линии из МПК и устанавливают приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища, и пептиды-кандидаты TUMAP, обладающие подходящей иммуногенностью, выбирают для включения в вакцину.

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

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

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

Каждый пептид, включаемый в продукт, растворяют в ДМСО. Концентрация отдельных пептидных растворов должна выбираться в зависимости от числа пептидов, предназначенных для включения в продукт. Растворы отдельных пептидов в ДМСО смешивают в равном соотношении для получения раствора, содержащего все пептиды, предназначенные для включения в продукт, с концентрацией ~2,5 мг/мл на пептид. Смешанный раствор затем разбавляют водой для инъекций в соотношении 1:3 для достижения концентрации 0,826 мг/мл на пептид в 33% ДМСО. Разбавленный раствор фильтруют через стерильный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Получают конечный нерасфасованный раствор.

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

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

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

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

Пептиды по настоящему изобретению могут использоваться в анализе ответов лимфоцитов на действие этих пептидов, таких как Т-клеточные ответы или ответы в виде антител к пептиду или пептиду в комплексе с молекулами МНС. Данные ответы лимфоцитов могут использоваться в качестве прогностических маркеров для принятия решения о дальнейших этапах терапии. Данные ответы могут также использоваться в качестве суррогатных маркеров ответов в иммунотерапевтических подходах, направленных на индуцирование ответов лимфоцитов с помощью различных средств, например вакцинации белком, нуклеиновыми кислотами, аутологичными материалами, адаптивным переносом лимфоцитов. В условиях, когда проводится генная терапия, в целях оценки побочных эффектов могут быть проанализи-

рованы ответы лимфоцитов на пептиды. Мониторинг реакций лимфоцитов может также быть ценным инструментом для обследований в рамках последующего наблюдения после трансплантации, к примеру, для выявления реакций "хозяин против трансплантата" и "трансплантат против хозяина".

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

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена экспрессия HLA-A, B, C (A) и HLA-DR (B) различными подгруппами клеток рака яичника и доброкачественной ткани яичника. Для фиг. 1 использовался непарный двусторонний t-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча по причине разной дисперсии двух групп сравнения. Экспрессия молекул HLA I класса (A) и HLA-DR (B) на различных видах клеток ЭРЯ и доброкачественной ткани яичника после ферментативной диссоциации, характеризующейся различными маркерами клеточной поверхности (лейкоцитарный компартмент: CD45⁺, опухолевые клетки/эпителиальный клеточный компартмент: CD45-EpCam (эпителиальные молекулы клеточной адгезии)⁺, эндотелиальный клеточный компартмент: CD45-CD31⁺). Каждой точке на графике соответствует среднее значение из трех повторных измерений, проведенных для каждого образца. Двусторонний t-критерий был использован для проверки значимости (*p<0,05; **p<0,01).

На фиг. 2A-D представлено сравнение профилей иммунопептидома ЭРЯ и доброкачественных тканей. (A) Сравнение профилей исходных белков лигандов HLA I класса, представленных в ЭРЯ (n=34), и доброкачественных тканях. HLA-рестриктированная частота встречаемости исходных белков показана на оси "y" отдельно для ЭРЯ (выше оси x) и доброкачественных тканей (ниже оси x). Для исходных белков был составлен рейтинг (слева направо) в соответствии с их частотой встречаемости, специфической для ЭРЯ. Прямоугольником слева выделена группа TOP 100 исходных белков лигандов HLA, эксклюзивно презентуемых при ЭРЯ. (B) Облако слов группы TOP 100 ЭРЯ-специфических исходных белков лигандов HLA I класса (название гена, рекомендуемое банком данных uniprot). Размер шрифта (5-26) коррелирует с абсолютным количеством больных раком, у которых наблюдалась презентация HLA-лигандов соответствующих исходных белков. (C) Сравнение профилей исходных белков лигандов HLA II класса, представленных в ЭРЯ (n=22) и доброкачественных тканях. (D) Облако слов группы TOP 100 ЭРЯ-специфических исходных белков лигандов HLA II класса (название гена, рекомендуемое банком данных uniprot). Размер шрифта (3-11) коррелирует с абсолютным количеством больных раком, у которых наблюдалась презентация HLA-лигандов соответствующих исходных белков.

На фиг. 3 представлено, из каких клеток получены члены группы TOP 100 лигандов HLA I класса, ассоциированные с ЭРЯ. Вулканоподобные графики относительной частоты присутствия HLA-лигандов в иммунопептидоме I класса обогащенных популяций клеток OvCa 84 с использованием количественного анализа без меток. В секциях слева (A) представлены лейкоциты, инфильтрующие опухоль (CD45⁺), по сравнению с опухолевыми клетками (CD45-EpCam⁺) и справа (B) - клетки стромы (CD45-EpCam⁺) по сравнению с опухолевыми клетками. Горизонтальные пунктирные линии обозначают порог значимости (p<0,05). Выделены ЭРЯ-эксклюзивные лиганды из группы TOP100 (MUC16 (красный), DDR1, EYA2, SOX9, TLR7, OASL), а также лиганды, полученные из антигенов, ассоциированных с лейкоцитами (CD132, CD8, LSP1), и антигенов (vWF), ассоциированных со стромой (эндотелиальные клетки).

На фиг. 4 представлено иммуногистохимическое окрашивание и уровни в сыворотке в качестве суррогатных маркеров презентации лигандов. Иммуногистохимическое окрашивание серозных карцином яичника высокой степени злокачественности для выявления MUC16 (CA-125) с низким (IRS4), средним (IRS6) и высоким (IRS12) уровнем иммунореактивности (A). Иммуногистохимическое окрашивание для выявления мезотелина (справа, IRS8) и IDO1 (слева, IRS 12; все с увеличением 200x) (B). Корреляция презентации HLA-лигандов и экспрессии исходного белка для выбранной группы TOP100 антигенов, ассоциированных с ЭРЯ. Экспрессию MUC16 (n=23), IDO1 (n=23) и MSLN (n=16) анализировали с помощью иммуногистохимического окрашивания (C) или определения сывороточного маркера CA-125 (n=30) в день хирургической операции (D). Для MSLN включены только те случаи, для которых имелись данные о иммунопептидоме HLA II класса. Непараметрический критерий Манна-Уитни использовали для проверки статистической значимости (p<0,05 принимали за значимые).

На фиг. 5 представлена прогностическая значимость MUC16 и MSLN. Иммуногистохимическое окрашивание проводили методом тканевых матриц на 71 образце серозного ЭРЯ высокой степени злокачественности пациентов с подтвержденной документально оптимальной циторедукцией опухоли. (A) График по методу Каплана-Мейера, показывающий влияние экспрессии MUC16 (левая секция, низкий балл экспрессии <7, n=41; высокий балл экспрессии >7, n=30) и экспрессии MSLN (правая секция, низкая экспрессия <6, n=15; высокая экспрессия >6, n=52) на общую выживаемость. (B) Влияние инфильтрации CD3 T-клетками внутриэпителиального компартмента (левая секция CD3E, низкая инфильтрация <7 клеток/HPF, n=13; высокая инфильтрация >7, n=57) или фиброваскулярной стромы (правая секция, CD3S, низкая инфильтрация <7 клеток/в поле зрения, n=40; высокая инфильтрация >7, n=30) на общую выживаемость пациентов. (C) Анализ в подгруппах комбинированного окрашивания CD3 и MLN

(все пороговые значения, как указано выше) для внутриэпителиальных CD3 Т-клеток (верхняя секция, низкий MSLN/высокий уровень CD3E, n=11; низкий MSLN/низкий CD3E, n=40; высокий MSLN/низкий CD3E, n=14; высокий MSLN/высокий CD3E, n=1) или фиброваскулярных CD3 Т-клеток (нижняя секция, низкий MSLN/высокий CD3S, n=30; высокий MSLN/низкий CD3S, n=7; низкий MSLN/низкий CD3S, n=21; высокий MSLN/высокий CD3S, n=8).

На фиг. 6 представлен анализ методом проточной цитометрии ткани ЭРЯ и доброкачественной ткани яичника. Представлен пример стратегии гейтирования для клеток OvCa 48 с демонстрацией отбора CD45⁺ лейкоцитов, CD45-CD31⁺ эндотелиальных клеток и CD45-EpCam⁺ опухолевых или эпителиальных клеток.

На фиг. 7 представлен анализ насыщения для идентификации исходных белков HLA-лигандов для ЭРЯ. Анализ насыщения для идентификаций исходных белков представлен в отдельности для белков лигандов HLA I класса (А) и HLA II класса (В). Среднее число уникальных исходных белков было подсчитано для каждого источника на основании 1000 случайных выборок из 34 источников ЭРЯ. Экспоненциальная регрессия использовалась для определения расчетного максимально достижимого уровня охвата регистрации исходных белков (точные линии) для ЭРЯ.

На фиг. 8 представлена частота и число презентаций HLA-лигандов среди образцов ЭРЯ. Презентация молекулами HLA выбранных ассоциированных с ЭРЯ антигенов, а также число различных презентуемых молекулами HLA пептидов (цветная маркировка) обозначена визуально для каждого отдельного случая ЭРЯ (номер пациента сверху каждого столбца) как для антигенов I класса (сверху), так и для антигенов II класса (внизу).

Примеры

Материалы и методы.

Образцы тканей.

Все ткани были собраны Университетской клиникой г. Тюбинген после получения информированного согласия пациентов в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Все протоколы клинических исследований были утверждены местным экспертным советом организации. Если не указано иное, образцы хранили при -80°C до дальнейшего использования. HLA-типирование до второго знака производили с помощью ПЦР с аллель-специфичным праймером (SSP) при использовании системы HLA-Ready Gene (Innotrain, Кронберг, Германия) и оценивали с помощью программного обеспечения SCORE (Olerup, Стокгольм, Швеция) в Отделении трансфузиологии Университетской клиники г. Тюбингена. HLA-типирование высокого разрешения до четвертого знака проводили способом секвенирования следующего поколения на оборудовании GS Junior Sequencer при использовании наборов праймеров GS GType HLA Primer Sets (оба компании Roche, Базель, Швейцария). Нормальные ткани были получены из компаний Bio-Options Inc., Калифорния, США; BioServe, Белтсвилл, Мэриленд, США; Capital BioScience Inc., Роквилл, Мэриленд, США; Geneticist Inc., Глендейл, Калифорния, США; Университетской клиники г. Женева; Университетской клиники г. Гейдельберг; Университетской клиники г. Мюнхена; компании ProteoGenex Inc., Калвер-Сити, Калифорния, США; Университетской клиники г. Тюбинген. Перед проведением хирургического операции или аутопсии было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после удаления ткани были подвергнуты шоковой заморозке и хранились до выделения TUMAP-пептидов при температуре -70°C или ниже.

Дезинтеграция тканей.

Ткани ЭРЯ, а также доброкачественные ткани яичника и маточных труб получали в свежем виде от пациентов, которые подвергались резекции опухоли/циторедукции или сальпингоофорэктомии. Ткани измельчали на фрагменты размером <2 мм³ и помещали в раствор ферментативной диссоциации, содержащий 400 Ед/мл коллагеназы IV типа, 5 Ед/мл диспазы (оба компании "life technologies", Карлсбад, Калифорния) и 0,1 мг/мл ДНКазы (Roche, Базель, Швейцария) в питательной среде DMEM (life technologies) с 10% фетальной телячьей сыворотки (Lonza, Базель, Швейцария). Диссоциацию проводили с помощью шоттель-аппарата с круговым вращением (Infors HT, Базель, Швейцария) в течение 3 ч при 37°C. Оставшиеся фрагменты ткани (обычно <1% исходной массы) удаляли с помощью клеточного фильтра с размером пор 100 мкм (BD, Фрэнклин Лейкс, Нью-Джерси, США). Одноклеточные суспензии промывали дважды в PBS, и эритроциты лизировали с помощью лизирующего буфера (раствор хлорида аммония).

Количественное определение молекул HLA на поверхности.

Экспрессию HLA на клеточной поверхности определяли при использовании набора для количественного определения методом проточной цитометрии QIFIKIT (Dako, Глоstrup, Дания) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки окрашивали специфичными к HLA I класса моноклональными антителами W6/32, специфичными к HLA-DR, L243 или контролем соответствующего изотипа. Распределение клеток по видам было основано на окрашивании поверхностного маркера с помощью антител с флуоресцентными метками к CD45 (AmCyan, клон 2D1, BD), к CD31 (PeCy7, клон WM59, Biolegend, Сан-Диего, Калифорния, США), к EpCam (APC, клон HEA125, Miltenyi, Бергш-Гладбах, Германия) и к CD34 (APCCy7, клон 581, Biolegend). 7-AAD (BioLegend) добавляли в качестве маркера жизнеспособности непосредственно перед анализом на анализаторе LSR SORP Fortessa (BD). Результаты трех парал-

тельных измерений записывали для каждого образца с медианными значениями интенсивности флуоресцентности, используемыми для подсчета экспрессии молекул на поверхности.

Разделение клеток.

Разделение клеток производили с использованием двух последовательных протоколов магнитного сортирования клеток (MACS) в соответствии с инструкциями производителя (Miltenyi). Разделение производили с использованием колонок XS и сепаратора superMACS (оба продукта компании Miltenyi). Первое разделение было направлено на положительный отбор лейкоцитов CD45⁺. Отрицательную фракцию затем обогащали опухолевыми клетками EpCam⁺. В оставшейся фракции CD45-EpCam⁺, как предполагалось, была представлена фракция клеток стромы.

Выделение HLA-лигандов.

Молекулы HLA I и II классов выделяли с помощью метода стандартной иммуноаффинной очистки, как было описано ранее (42). Универсальные моноклональные антитела W6/32, специфичные к HLA I класса, использовали для выделения молекул HLA I класса и универсальные моноклональные антитела Tü39 - для выделения молекул HLA II класса, а также HLA-DR-специфичные моноклональные антитела L243 использовали для выделения молекул HLA II класса.

Анализ иммунопептидома методом ЖХ-МС/МС.

Анализ иммунопептидома проводили на масс-спектрометре LTQ OrbitrapXL (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США), снабженном наноэлектроспреем в качестве источника ионов и связанном с системой УВЭЖХ Ultimate 3000 RSLC Nano (Dionex, Саннивейл, Калифорния, США). Образцы пептидов загружали с 3% растворителя В (20% H₂O, 80% ацетонитрил и 0,04% муравьиной кислоты) в колонку 2 см RepMap 100 C18 Nanotrap (Dionex) при скорости потока 4 мкл/мин на 10 мин. Разделение производили на колонке 50 см RepMap C18 с размером частиц 2 мкм (Dionex), установленной на термостате колонки с установленной температурой 50°C. Применявшийся градиент находился в диапазоне от 3 до 30% растворителя В в течение 140 мин при скорости потока 175 нл[нл]/мин. (Растворитель А: 99% H₂O, 1% ACN и 0,1% муравьиной кислоты; растворитель В: 20% H₂O, 80% ACN и 0,1% муравьиной кислоты). Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме зависимого от данных анализа при использовании метода первой пятерки (т.е. во время каждого обзорного скана для фрагментации выбирались пять наиболее распространенных ионов-предшественников). Обзорные сканы записывали на Orbitrap с разрешением 60000. Анализ МС-МС проводили методом диссоциации, индуцированной столкновением (CID, нормализованная энергия столкновения 35%, время активации 30 мс, ширина изоляции масс 1,3 m/z), с последующим анализом с линейной квадрупольной ионной ловушкой (LTQ). Диапазон значения масс лигандов молекул HLA I класса был ограничен 400-650 m/z с возможным состоянием заряда 2+ и 3+, выбранным для фрагментации. Для молекул HLA II класса диапазон масс был установлен в пределах 300-1500 m/z, позволяя проводить фрагментацию с состояниями положительного заряда ≥ 2 .

Образцы HLA I класса анализировали в пяти технических репликатах, тогда как для образцов HLA II класса обычно использовали три технических репликата. Первые измерения проводили без динамического исключения, тогда как для последующих измерений применяли динамическое исключение с длительностью 5 с.

Обработка и анализ данных спектрометрического анализа.

Анализ данных МС производили с помощью программного обеспечения Proteome discoverer 1.3 (ThermoFisher). Списки пиков сравнивали с белками протеома человека, включенными в банк данных Swiss-Prot (www.uniprot.org, опубликованным 27 сентября 2013 г.; включающим 20279 проверенных белковых последовательностей) с применением поисковой системы Mascot (Mascot 2.2.04, Matrix Science, Бостон, Массачусетс). Допуск по массе для обработки составлял 5 миллионных долей для ионов-предшественников и 0,5 Да для осколочных ионов. Специфичность расщепления не устанавливали, и окисленный метионин был единственной допущенной динамической модификацией. Доверительный интервал для пептида был установлен с помощью алгоритма percolator с целевым значением $q \leq 0,05$ (5% FDR, уровень ложноположительных обнаружений). Дополнительными фильтрами последующей обработки были количество баллов достоверности МС-идентификации ионов (Mascot Ionscore) ≥ 20 , ранг по поисковой системе = 1 и длина пептида 8-12 аминокислот для HLA-лигандов I класса и 12-25 аминокислот для HLA-лигандов II класса. Функция группировки пептидов была отключена для обеспечения возможности нескольких идентификаций пептидов, если последовательности картируются в несколько белков в связи с наличием консервативных участков. Идентификацию HLA производили с помощью алгоритма предсказания HLA, размещенного на сайте SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) и NETMHC 3.4 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>). В случае неоднозначных результатов указывают несколько аллелей. Для сравнения профилей белки, детектируемые только по одному пептиду, т.е. пептиды, представленные только на одном источнике со значением PSM (совпадения пептидных спектров) ≤ 5 , были удалены из обоих банков данных.

Количественное определение пептида без изотопных меток на клетках опухоли в сравнении с клетками CD45⁺ и на клетках опухоли в сравнении со стромой опухоли производили с помощью Sieve 2.1 (Thermo Fisher). Производили совместное выравнивание последовательностей не менее трех репликатов

исходных файлов данных МС для каждой обогащенной фракции клеток, а также результатов преципитации МНС из цельной ткани с максимальным временем удерживания (RT) на цикл 2,5 мин. Рамки генерировали на основании сигналов на сканах MS² с максимальной шириной RT 3,5 мин и допуском по массе 5 миллионных долей. Идентифицированные последовательности импортировали из Proteome discoverer с помощью поисковой системы Mascot (см. выше). Нормализацию хроматограмм общего ионного тока использовали для согласования различий интенсивности сигнала образцов.

Анализ иммуногенности лигандов HLA I класса.

Прайминг пептид-специфических цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) производили на основании известного протокола с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК) (30). иАПК состояли из полистирольных гранул, покрытых стрептавидином (диаметром 5,6 мкм; Bangs Laboratories, Фишерс, Индиана, США). Гранулы ресуспендировали в количестве 2×10^6 частиц на 1 мл и инкубировали с 10 нМ биотинилированным пептидом в комплексе с МНС и 10 нМ стимулирующего антитела к CD28 (клон 9,3 из коллекции ATCC, Манасас, Вирджиния, США) в течение 30 мин каждую при комнатной температуре. Т-клетки выделяли из цельной крови здоровых доноров с помощью набора для выделения CD8 методом магнитной сепарации клеток (Miltenyi). 1 млн Т-клеток на лунку культивировали в 96-луночных планшетах (Corning, Corning, Нью-Йорк, США) и стимулировали тем же количеством нагруженных иАПК в присутствии 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell, Гейдельберг, Германия). Т-клетки стимулировали в общей сложности 3 раза с интервалом в одну неделю между стимуляциями. Через 2 дня после каждой стимуляции добавляли 40 ед/мл ИЛ-2. Прайминг Т-клеток оценивали с помощью окрашивания мультимерами в комплексе с МНС через одну неделю после последнего цикла стимуляций.

Конструирование тканевых микроматриц (ТМА).

Последовательные образцы опухолевой ткани, залитые в парафин, пациентов с серозной карциномой яичника или маточных труб высокой степени злокачественности (ЭРЯ) не менее чем с II-III стадией по FIGO, хирургическая операция которым была сделана в Университетской клинике г. Тюбинген в Отделении женского здоровья между 1999 и 2008 гг., были получены из архивов Института патологии. После подтверждения гистологического подтипа и степени злокачественности в соответствии с опубликованными критериями (43) в исследование было первоначально включено 154 случая. Конструирование тканевых микроматриц (ТМА) производили, как было описано ранее (44). Авторы изобретения использовали по шесть тканевых столбиков диаметром 0,6 мм каждого пациента (не более трех тканевых столбиков, отбираемых из двух различных участков первичных опухолей - не менее двух отдельных тканевых столбиков). Для анализа лигандома авторы изобретения также конструировали микроматрицы ТМА с использованием образцов залитой в ипарафин ткани первичных опухолей, собранных проспективно. Из образцов были изготовлены срезы толщиной 3 мкм, их регидратировали и подвергали специфической предварительной обработке для методов иммуногистохимии. В общей сложности количественному определению индекса иммуноактивности и корреляции с данными о иммунопептидоме подлежали 23 случая.

Иммуногистохимический анализ.

Для иммуногистохимического исследования использовали следующие первичные антитела и разведения: CD3 (1:100, крысиное, моноклональное SP7, DCS, Гамбург, Германия), CD8 (1:200, мышинное, моноклональное C8/144B, DAKO), MUC16 (1:450, мышинное, моноклональное M11, DAKO, Глоструп, Дания), IDO1 (1:25, мышинное, моноклональное, ABCAM, Кембридж, Великобритания) и MSLN (1:100, мышинное, моноклональное SPM143, GeneTex, Ирвайн, Калифорния, США). Срезы ткани предварительно обрабатывали буферным раствором ЭДТА (pH 8,6) при 95°C в течение 36 мин. Иммуногистохимическое окрашивание производили на автоматическом иммуноштейнере в соответствии с инструкциями производителя с использованием набора для выявления iView DAB (оба Ventana, Тусон, Аризона, США).

Определение индекса иммунореактивности.

Определение количества инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ) производили, оценивая сначала среднее число иммуноокрашенных клеток в поле зрения микроскопа под большим увеличением (HPF=400×) с подсчетом как минимум 2 HPF для каждого тканевого столбика. На втором этапе подсчитывали среднее число лимфоцитов на HPF для набора из трех тканевых столбиков слева и справа и для всех тканевых столбиков вместе. Результаты этого двустороннего подсчета среднего значения использовали в дальнейших расчетах. Фиброваскулярную строму опухоли (CD3S и CD8S) и внутриэпителиальный компартмент опухоли (CD3E и CD8E) оценивали в отдельности.

Для определения экспрессии CA 125, IDO1 и MSLN индекс интенсивности окрашивания распределили на категории 0-3, для выражения процентной доли опухолевых клеток этот индекс умножали на баллы 1-4 (1: 0-10%; 2: 10-50%; 3: 50-80%; 4: 80-100%). По всем параметрам случаи делили на квартили и лучшее разделение между двумя квартилями принимали за пороговое значение между высоким и низким уровнем экспрессии. Из 154 случаев ТМА 71 пациент подвергся подтвержденной документально оптимальной циторедукции опухоли (<1 см остаточной опухолевой массы) и мог успешно пройти оценку относительно ИОЛ и экспрессии белков. Определение индекса иммунореактивности и анализ клинических данных производили независимые исследователи.

Статистический анализ/визуализация.

Если не указано иное, все рисунки и данные статистических анализов были получены с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 6.0 (Graphpad software, Ла Джолла, Калифорния, США) или Microsoft Office 2010 (Microsoft). Облака слов были созданы с помощью мини-приложения из интернет-ресурса (www.wordle.net). Анализ по методу Каплана-Мейера производили при использовании статистического программного обеспечения SPSS (версия 21, IBM Corp., Армонк, Нью-Йорк, США). Применяли анализ с использованием непарного t-критерия Стьюдента, если не указано иное. Р-значения менее 0,05 принимали за статистически значимые. Для подтверждения нормальности распределения использовали составной критерий Д'Агостино-Пирсона и для подтверждения равенства дисперсий использовали F-критерий. Для фиг. 1 использовался непарный двусторонний t-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча по причине разной дисперсии двух групп сравнения. Непараметрический критерий Манна-Уитни использовали на фиг. 4, поскольку нормальное распределение нельзя было оценить во всех случаях в связи с малым размером выборки. Корреляция Спирмана применялась для составления корреляции иммуногистохимического (ИГХ) показателя для белков MSLN и MUC16, так как наборы данных не имели нормального распределения. Р-значения сравнения двух кривых выживаемости по методу Каплана-Мейера на фиг. 5 были рассчитаны с использованием логарифмического рангового критерия (критерий Кокса-Ментела) в программном обеспечении Graphpad Prism.

Пример 1. Количество молекул HLA на поверхности клеток и HLA-типирование.

Основным предварительным условием для разработки средств иммунотерапии, опосредованной Т-клетками, является экспрессия молекул МНС на поверхности опухолевых клеток. Поэтому авторы изобретения проанализировали и провели количественный анализ ряда молекул HLA-A, В, С, а также молекул HLA-DR с помощью проточной цитометрии на различных подгруппах клеток опухолей яичника (n=11), а также и доброкачественных тканей яичника и маточных труб (n=8), полученных с помощью ферментативной диссоциации. Анализ был направлен на раздельное количественное определение специфической в зависимости от вида клетки экспрессии молекул HLA для лейкоцитов (CD45⁺), опухолевых/эпителиальных клеток (EpCam⁺) и эндотелиальных клеток (CD31⁺; последние только в подгруппе 7 опухолей яичника). Полная информация по стратегии гейтирования представлена на фиг. 6. Медиана числа молекул HLA на клетку была гетерогенной как среди различных видов клеток, так и отдельных пациентов и находилась в диапазоне от ~5,000 до 150000 молекул HLA I класса и от ~500 до 330000 молекул HLA-DR. Число молекул HLA-A, В и С было значительно выше (p=0,0205) на лейкоцитах, выделенных из опухоли, по сравнению с доброкачественной тканью, указывая на проходящую внутри опухоли воспалительную реакцию. Сильные различия уровня экспрессии молекул HLA I класса наблюдались также при сравнении опухолевых клеток с эпителиальными клетками, полученными из доброкачественных тканей. Экспрессия молекул HLA I класса была значимо (p=0,0021) выше на опухолевых клетках (~75000 молекул/клетка), но находилась в диапазоне других клеток стромы, таких как эндотелиальные клетки (~95000 молекул/клетка). Неожиданно авторы изобретения выявили высокую (~105000 молекул/клетка) до чрезвычайно высокой экспрессии молекул HLA-DR на клетках ЭРЯ (>300000 молекул/клетка), тогда как доброкачественные клетки эпителия были практически негативными по HLA-DR (p=0,0108). Подводя итог, авторы изобретения могли наблюдать повышенные уровни экспрессии МНС I и II класса внутри опухолей.

С помощью анализа HLA-лиганда и сравнения профилей экспрессии обнаруживается ЭРЯ-специфическая презентация антигенов. В целях картирования различных HLA-лигандов ЭРЯ авторы изобретения выделили молекулы HLA из массы опухолевой ткани и провели масс-спектрометрический анализ, чтобы охарактеризовать HLA-лиганды в общей сложности 34 случаев ЭРЯ (характеристики пациентов и HLA-типирование представлены в табл. 7).

Таблица 7

Ид. номер пациента с раком яичника (РЯ)	Возр.	Вид опухоли	Стадия по TNM	HLA-типирование МНС I класса	HLA-типирование МНС II класса
OvCa 9	65	Серозная карцинома яичника	T3cNx M1G2R 1	A*02:01, A*03:01, B*07:02, B*40:02, C*07:02, C*12:01	DQB1*03:01, DQA1*03:01, DQA1*05:01, DRB1*11:01, DRB1*04:01, DRB3*02:02, DRB4*01:01, DPB1*02:01, DPB1*13:01
OvCa 10	60	Серозная карцинома яичника	T3bN1 M1G2R 1	A*02:01, A*11:01, B*44:05, B*51:01, C*02:02, C*15:02	DQB1*02:02, DQB1*05:01, DQA1*01:01, DQA1*03:01, DRB1*01:01, DRB1*09:01, DRB4*01:01, DPB1*04:01, DPB1*05:01
OvCa 12	62	Серозная карцинома	T3cN0 G2R0	A*24:02, A*31:01,	DQB1*03:01, DQB1*05:04, DQA1*01:02, DQA1*03:01,

		а яичника		B*35:03, B*49:01, C*07:01, C*12:03	DRB1*01:01, DRB1*04:01, DRB4*01:01, DPB1*02:01, DPB1*05:01
OvCa 13	62	Серозная карцином а яичника	T1cN1 G3R0	A*02, B*35, B*40, C*03, C*04	DQB1*04, DQB1*06, DRB1*08, DRB1*13
OvCa 15	75	Серозная карцином а яичника	T3cN0 G3R0	A*11:01, A*24:02, B*07:02, B*55:01, C*03:03, C*07:02	DQB1*03:01, DQA1*05:01, DRB1*11:01, DRB1*03:17, DRB3*02:02, DPB1*03:01
OvCa 16	45	Серозная карцином а яичника	T3bN1 G3R0	A*02, B*40, B*44, C*03, C*05	DQB1*06, DRB1*08, DRB1*13, DRB1*14, DRB3
OvCa 23	29	Серозная карцином а яичника	T3aN1 G3R0	A*01, A*03, B*08, B*35, C*04, C*07	DQB1*02, DQB1*03, DRB1*03, DRB1*12, DRB3
OvCa 28	66	Серозная карцином а яичника	T2bN0 G3R0	A*01:01, A*02:01, B*27:05, B*52:01, C*01:02, C*02:02	DQB1*05:01, DQB1*06:01, DQA1*01:01, DQA1*03:01 DRB1*01:03, DRB1*15:02, DRB5*01:02, DPB1*04:01
OvCa 39	45	Серозная карцином а яичника	T3cN1 G3R1	A*25:01, A*31:01, B*07:02, B*18:01, C*12:03, C*07:02	DQB1*06:02, DQA1*01:02, DRB1*15:01, DRB1*16:09, DRB5*01:01, DRB5*01:11, DPB1*04:01, DPB1*04:02
OvCa 41	66	Серозная и эндометр оидная карцином а яичника	T3cN0 G3R1	A*02, A*24, B*18, B*51, C*02, C*12	DQB1*03, DQ7, DRB1*11, DRB3
OvCa 43	61	Серозная карцином а яичника	T3cN1 G3R2	A*02, A*32, B*18, B*35, C*04, C*07	DQB1*03, DQB1*05, DQ9, DRB1*01, DRB1*07, DRB4
OvCa 45	63	Карцино ма яичника со смешанн ой	T1cN0 G3R0	A*01, A*23, B*08, B*44, C*04, C*07	DQB1*02, DRB1*03, DRB1*07, DRB3, DRB4

		дифференциацией (преимущественно эндометриодная)			
OvCa 48	71	Серозная карцинома яичника	T3cN1 G3R0	A*02:01, A*25:01, B*15:01, B*41:02, C*03:04, C*17:01	DQB1*03:02, DQB1*03:04, DQA1*03:01, DRB1*04:01, DRB1*13:03, DRB3*01:01, DRB4*01:01, DPB1*02:01
OvCa 53	48	Серозная карцинома яичника	T3bN1 G3R0	A*02, A*03, B*27, B*35, C*02, C*04	DQB1*02, DQB1*03, DQ7, DRB1*03, DRB1*11, DRB3
OvCa 54	66	Серозная карцинома яичника	T3cN1 M1G3R2	A*02:01, A*11:01, B*35:01, B*35:03, C*04:01, C*12:03	DQB1*05:01, DQB1*05:03, DQA1*01:01, DRB1*01:03, DRB1*14:01, DRB3*02:02, DPB1*04:01, DPB1*02:01
OvCa 57	58	Эндометриодная карцинома яичника	T1cN0 G1R0	A*25, A*32, B*15, B*18, C*03, C*12	DQB1*05, DQB1*06, DRB1*01, DRB1*15, DRB5
OvCa 58	74	Серозная карцинома яичника	T3cN1 G3R1	A*02, A*03, B*35, C*03, C*04	DQB1*05, DRB1*01
OvCa 59	47	Серозная карцинома яичника	T3cN1 G3R2	A*03, A*30, B*13, C*06	DQB1*02, DRB1*07, DRB4
OvCa 60	50	Серозная карцинома яичника	T3cN1 G3R1	A*24:02, A*25:01, B*13:02, B*18:01, C*12:03, C*06:02	DRB1*08:01, DRB1*13:01, DQB1*04:02, DQB1*06:03, DQA1*04:01, DQA1*01:03, DPB1*02:01, DPB1*03:01
OvCa 64	56	Серозная карцинома яичника	T3cN1 G3R1	A*01, A*25, B*08, C*07	DQB1*02, DRB1*03, DRB3
OvCa 65	55	Серозная карцинома яичника	T3cN1 M1G3R1	A*01, A*24, B*15, B*35, C*04, C*14	DQB1*03, DQB1*05, DRB1*10, DRB1*11, DRB3
OvCa 66	73	Серозная карцинома яичника	T2bN0 G3R0	A*11:01, A*29:02, B*18:01,	DRB1*03, DRB*0701, DRB3*0202, DRB4*0101, DQB1*02:01, DQB1*02:02,

				B*44:03, C*05:01, C*16:01	DQA1*02:01, DQA1*05:01, DPB1*02:02, DPB1*03:01
OvCa 68	69	Серозная карцином а яичника	T3cN1 G3R1	A*02:01, A*01:01, B*44:02, B*37:01, C*06:02, C*05:01	DRB1*10:01, DRB1*04:01, DRB4*04:01, DQB1*05:01, DQB1*03:01, DQA1*01:01, DPB1*04:01
OvCa 69	68	Серозная карцином а яичника	T3cN0 G1R1	n/a	n/a
OvCa 70	48	Серозная карцином а яичника	T3cN1 M1G1R 1	A*01, A*02, B*07, C*07	DQB1*03, DQB1*05, DRB1*09, DRB1*14, DRB3, DRB4
OvCa 72	53	Серозная карцином а яичника	T3bN1 G3R0	A*03:01, A*01:01, B*08:01, B*07:02, C*07:02, C*07:01	DRB1*01:01, DRB1*03:01, DRB3*01:01, DQB1*05:01, DQB1*02:01, DQA1*01:01, DPB1*04:01
OvCa 73	69	Серозная карцином а яичника	T3cN1 G3R0	A*01:01, B*08:01, C*07:01	DRB1*03:01, DRB1*03:42, DRB3*01:01, DRB3*01:14, DQB1*02:01, DQA1*05:01, DPB1*04:01
OvCa 74	79	Эндомет роидная карцином а яичника	T3bNx G1R1	A*02:01, B*18:01, B*51:01, C*07:02, C*15:02	DRB1*11:04, DRB1*07:01, DRB3*02:02, DRB4*01:01, DQB1*03:01, DQB1*02:02, DQA1*02:01, DQA1*05:01, DPB1*04:02, DPB1*02:01
OvCa 79	57	Эндомет роидная карцином а яичника	T2bN0 G2R0	A*01:01, A*31:01, B*08:01, B*51:01, C*07:01, C*15:02	DQB1*03:03, DQA1*02:01, DRB1*07:01, DRB1*09:01, DRB4*01:01, DPB1*13:01, DPB1*02:01
OvCa 80	93	Серозная карцином а яичника	T3cNx G3R2	A*25:01, A*32:01, B*18:01, B*39:01, C*12:03	DRB1*01:01, DRB1*12:01, DRB3*02:02, DQB1*03:01, DQB1*05:01, DQA1*01:01, DQA1*05:01, DPB1*04:01
OvCa 81	78	Серозная карцином а яичника	T3cNx G3R2	A*02:01, B*45:01, B*56:01, C*07:02, C*01:02	DRB1*04:02, DRBB1*11:01, DRB4*01:01, DRB3*02:02, DQB1*03:01, DQB1*03:02
OvCa 82	48	Серозная карцином а яичника	T3cN1 G3R0	A*01:01, A*03:01, B*08:01, B*38:01, C*07:01, C*12:03	DRB1*04:02, DRB1*03:01, DRB4*01:01, DRB3*01:01, DQB1*02:01, DQB1*03:02, DQA1*03:01, DQA1*05:01, DPB1*04:01, DPB1*13:01
OvCa 83	50	Серозная карцином а яичника	T1cN0 G2R0	A*02, A*11, B*51, B*55, C*03, C*15	DQB1*03, DQB1*05, DRB1*09, DRB1*14, DRB3, DRB4
OvCa 84	70	Серозная карцином а яичника	T3cN1 G3R1	A*02:01, B*07:02, B*44:02, C*07:02, C*05:01	DRB1*15:01, DRB5*01:01, DQB1*06:02, DQA1*01:02, DPB1*04:01, DPB1*04:02

Для МНС I класса авторы изобретения могли идентифицировать 22920 уникальных пептидов (в среднем 1263/образец), выделенных из 9136 различных исходных белков (в среднем 1239/образец), достигнув >90% предполагаемого максимально достижимого охвата (см. фиг. 7А).

Пример 2. Идентификация наилучших ассоциированных с раком HLA-лигандов.

Имея целью выделить из обширного каталога данных HLA-лиганды, наиболее специфические для ЭРЯ, авторы изобретения сравнили исходные белки лигандов HLA с собственным банком данных доброкачественных источников ("банк данных доброкачественных лигандов HLA"), состоящим из образцов из МКПК (n=30), костного мозга (n=10), печени (n=15), толстой кишки (n=12), яичника (n=4) и почек (n=16). Банк данных доброкачественных лигандов HLA содержит 31032 пептида, представляющих 10012 исходных белка и был составлен при использовании крови и костного мозга здоровых доноров, а также прошедших гистопатологический анализ нормальных тканей, все из которых были проанализированы с помощью той же самой платформы, что и в случае ЭРЯ. Для сравнения профилей пептиды, представленные только на одном источнике, с низким значением PSM были удалены из обоих банков данных, чтобы исключить ложноположительные результаты. Сравнительный анализ двух соответствующих наборов данных (см. фиг. 2А) выявил, что 379 исходных белков молекул МНС I класса эксклюзивно презентуются в образцах ЭРЯ по меньшей мере у трех из исследованных пациентов, выделив спектр

ЭРЯ-специфических пептидов. Группа TOP 100 ЭРЯ-специфических исходных белков в соответствии с их частотой встречаемости представлена на фиг. 2В. Наиболее важным ЭРЯ-специфическим исходным белком лиганда HLA, полученным в ходе этого анализа, стал муцин 16 (MUC16), известный также как раковый антиген 125 (CA-125). В общей сложности более чем 80 различных HLA-лигандов, полученных из MUC16 (см. табл. 8) были представлены приблизительно у 80% пациентов (26/34).

Таблица 8

Последовательность	Идент. номер	Источники	HLA
AHSKITTAM	3	OvCa 80	B*39:01
AVKTETSTSER	4	OvCa 12, OvCa 79	A*31:01
AVTNVRTSI	5	OvCa 59, OvCa 60	B*13
DALTPLVTI	6	OvCa 74	B*51:01
DALVLKTV	7	OvCa 41, OvCa 74, OvCa 79, OvCa 83	B*51
DPYKATSAV	8	OvCa 10, OvCa 41, OvCa 69, OvCa 74, OvCa 79, OvCa 83	B*51
EPETTTSFITY	9	OvCa 65	B*35
ERSPVIQTL	10	OvCa 80	B*39:01
ETILTFHAF	11	OvCa 48, OvCa 64, OvCa 80	A*25
EVISSRGTSM	12	OvCa 48, OvCa 60, OvCa 64, OvCa 80	A*25
EVITSSRTTI	13	OvCa 60, OvCa 64	A*25
EVTSSGRISI	14	OvCa 60, OvCa 64, OvCa 80	A*25
FPEKTTTHSF	15	OvCa 65	B*35
FPHSEETTM	16	OvCa 13, OvCa 65	B*35
FPHSEITTL	17	OvCa 12, OvCa 13, OvCa 53	B*35
FQRQGQTAL	18	OvCa 48	B*15:01
GDVPRPSSL	19	OvCa 72	B*08:01
GHESHSPAL	20	OvCa 80	B*39:01
GHTTVSTSM	21	OvCa 80	B*39:01
GTHSPVTQR	22	OvCa 39, OvCa 79	A*31:01
GTSGTPVSK	23	OvCa 83	A*11
HPDPQSPGL	24	OvCa 65	B*35
IITEVITRL	547	OvCa 83	A*02
IPRVFTSSI	25	OvCa 41, OvCa 74	B*51

ISDEVVTRL	26	OvCa 16	C*05
ISIGTIPRI	27	OvCa 65	B*15:17
ISKEDVTSI	28	OvCa 65	B*15:17
ITETSAVLY	29	OvCa 65	A*01
ITRLPTSSI	30	OvCa 65	B*15:17
KDTAHTeam	31	OvCa 68	B*44:02
KEDSTALVM	32	OvCa 16	B*40/B*44
KEVTSSSSVL	33	OvCa 16, OvCa 70	B*40/B*44/?
KMISAIPTL	548	OvCa 81, OvCa 83	A*02
LPHSEITTL	34	OvCa 12, OvCa 13	B*35
LTISTHKTl	35	OvCa 65	B*15:17
LTKSEERTI	36	OvCa 65	B*15:17
QFITSTNTF	1	OvCa 60	A*24:02
RDSLYVNGF	37	OvCa 68	B*44:02
RETSTSQKI	38	OvCa 60	B*18:01
RSSGVTFSR	39	OvCa 79	A*31:01
SAFESHSTV	40	OvCa 41, OvCa 74, OvCa 79, OvCa 83	B*51
SATERSASL	41	OvCa 13, OvCa 16, OvCa 70	C*03/?
SENSETTAL	42	OvCa 16, OvCa 70	B*40/B*44/?
SEQRTSPSL	43	OvCa 70	n.a.
SESPSTIKL	44	OvCa 13, OvCa 70	B*40/?
SPAGEAHSL	45	OvCa 72, OvCa 81, OvCa 84	B*07/B*56
SPAGEAHSLA	46	OvCa 81	B*56:01
SPHPVSTTF	47	OvCa 84	B*07:02
SPHPVTALL	48	OvCa 9, OvCa 72, OvCa 84	B*07:02
SPLFQRSSL	49	OvCa 72	B*07:02
SPQNLRLNTL	50	OvCa 23, OvCa 72, OvCa 84	B*35/B*07:02
SPRLNTQGNTAL	51	OvCa 72, OvCa 84	B*07:02
SPSEAITRL	52	OvCa 84	B*07:02
SPSKAFASL	53	OvCa 9, OvCa 23, OvCa 39, OvCa 69, OvCa 72, OvCa 84	B*35/B*07:02
SPSSPTPKV	54	OvCa 72	B*07:02
SPSSQAPVL	55	OvCa 84	B*07:02
SQGFSHSQM	56	OvCa 48	B*15:01
SRTEVISSR	57	OvCa 53	B*27
SSAVSTTTI	58	OvCa 65	B*15:17
SSPLRVTSL	59	OvCa 69	n.a.
STASSSLSK	60	OvCa 83	A*11
STETSTVLY	2	OvCa 64, OvCa 65, OvCa 68	A*01
STQRVTISM	61	OvCa 72	n.a.
STSQEIHSATK	62	OvCa 83	A*11
SVLADLVTTK	63	OvCa 72	A*03:01
SVPDILSTSW	64	OvCa 60	A*24:02
TAGPTTHQF	65	OvCa 58	C*03
TEISSRSTSI	66	OvCa 12	B*49:01
TENTGKEKL	67	OvCa 16	B*40/B*44
TETEAHV	68	OvCa 41, OvCa 80	B*18
TEVSRTEVI	69	OvCa 12	B*49:01
TEVLQGLL	70	OvCa 16, OvCa 66, OvCa 70	B*40/B*44/?
TPGGTRQSL	71	OvCa 9, OvCa 23, OvCa 39, OvCa 72, OvCa 84	B*07:02/B*35
TPGNRAISL	72	OvCa 23, OvCa 72, OvCa 84	B*07:02/B*35
TPNSRGETSL	73	OvCa 72	B*07:02
TSGPVTEKY	74	OvCa 58	B*35
TSPAGEAHSL	75	OvCa 81	n.a.
TTLPESRPS	324	OvCa 70	n.a.
TYSEKTLF	549	OvCa 12, OvCa 41, OvCa 60, OvCa 65	A*24
VHESHSSVL	76	OvCa 80	B*39:01
VPRSAATTL	77	OvCa 23, OvCa 72, OvCa 84	B*07:02/B*35
VTSAIPRSI	78	OvCa 65	B*15:17
VTSSRSTSI	79	OvCa 65	B*15:17
YPDPKASSAM	80	OvCa 65	B*35

Эти данные подчеркивают частое процессирование и презентацию MUC16 множеством различных аллотипов HLA, не имеющих аналогов в случае любых других ЭРЯ-специфических антигенов, и их зеркальным отражением являются только часто (>95%) презентируемые служебные белки, такие как бета-актин (идентифицировано в общей сложности 149 различных пептидов), группы TOP100 ЭРЯ-специфических исходных белков были идентифицированы другие хорошо известные опухолеассо-

цированные антигены, как MUC1 или KLK10, а также антигены с имеющими документальное подтверждение функциями уклоняться от иммунного ответа, такими как индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO1) или галектин 1 (LGALS1).

Исходя из способности CD4 Т-клеток поддерживать или вызывать противоопухолевый иммунный ответ, авторы изобретения использовали тот же подход для дальнейшего анализа пептидов, презентируемых молекулами МНС II класса в ЭРЯ (n=22), получив в результате 9162 пептида (в среднем 598/образец), представляющих 2330 исходных белков (в среднем 319/образец), достигнув >80% максимально достижимого охвата (см. фиг. 7B). Набор данных по доброкачественным HLA-лигандам для молекул МНС II класса содержал 7267 пептидов, представляющих 1719 исходных белков, полученных из костного мозга (n=5), МКПК (n=13), толстой кишки (n=2), печени (n=7) и почек (n=17). Анализ группы TOP 100 антигенов, презентируемых молекулами МНС II класса, выявил более неоднородную и сложную картину (фиг. 2C). Примечательно, что пептиды мезотелина (MSLN), известного лиганда белка MUC16, презентируемые МНС, удалось идентифицировать практически у 50% пациентов (10/22; фиг. 2D). MUC16 сам по себе не входил в группу TOP100 антигенов II класса, но соответствующие лиганды, тем не менее, могли быть обнаружены у четырех пациентов.

Кроме группы TOP100 ЭРЯ-специфических исходных белков HLA-лигандов, авторы изобретения провели поиск известных раково-тестикулярных и опухолеассоциированных антигенов, которые ранее нашли клиническое применение для подтверждения высокой частоты их присутствия (Her2neu, WT1, NY-ESO-1, hTert и p53). Хотя авторы изобретения смогли идентифицировать пептиды, презентируемые молекулами HLA, для всех антигенов, за исключением NY-ESO-1, ни один из них не презентировался эксклюзивно на ЭРЯ (табл. 9). Единственными лигандами, демонстрирующими ЭРЯ-специфическую встречаемость, хотя и с низкой частотой (3/34), были лиганды HLA I класса (но не HLA II класса) белка Her2neu.

Таблица 9

SEQ ID	Her2neu	HLA-рестрикция	Источники, в которых он присутствует
	ERBB2 (рецепторная тирозинкиназа erbB-2)		
554	TYLPTNASLSF	A*23/A*24	2x OvCa
153	MPNPEGRTYTF	B*35	1x OvCa
152	AARPAGATL	B*07	1x OvCa
291	AIKVLRENTSPKANKE	HLA II класса	1x OvCa
292	DPSPLQRYSEDPTVPLPS	HLA II класса	2x OvCa
293	DPSPLQRYSEDPTVPLPSE	HLA II класса	1x OvCa
294	ELVSEFSRMARD	HLA II класса	2 МКПК
295	ELVSEFSRMARDPQ	HLA II класса	2 МКПК, 1 почка
296	IPVAIKVLRENTSPKANKE	HLA II класса	1 РЯ
297	RRLLQETELVEPLTPS	HLA II класса	2 печени
298	SPQPEYVNQPDVRPQPP	HLA II класса	1 РЯ
291	VKPDLSYMPIWKFPDE	HLA II класса	1 РЯ
	WT-1		
	Белок опухоли Вильмса		
558	RMFPNAPYL	A*02	8 МКПК, 1 печень
557	QRNMTKLQL	B*13	2 РЯ, 1 печень, 1 МКПК
555	GVFRGIQDV	B*13	2 РЯ
550	ALLPAVPSL	A*02	1 РЯ
	hTert		
	Теломераза - обратная транскриптаза		
556	LMSVYVVEL	A*02	2 МКПК
	p53		
	Клеточный опухолевый антиген p53		
552	RPILTIITL	B*07	4 МКПК, 2 печени, 2 почки, 3 РЯ
553	TYSPALNKMf	A*24	2 МКПК, 1 печень, 2 РЯ
551	GRNSFEVRV	B*27	1 МКПК, 1 печень, 1 почка, 1 РЯ

Пример 3. Клеточные источники ЭРЯ-ассоциированных пептидов, презентируемых молекулами HLA.

Поскольку ЭРЯ охватывает не только раковые клетки, а гетерогенную смесь различных видов клеток, авторы изобретения решили выяснить, действительно ли антигены МНС I класса из группы TOP100 первоначально презентировались раковыми клетками. Для этой цели авторы изобретения провели переваривание клеток ЭРЯ и выделили CD45⁺ лейкоциты, ЕрCam⁺ опухолевые клетки, а также стромальные

клетки, негативные по двум маркерам (относительно эффективности обогащения см. табл. 10), и затем провели анализ по методам HLA-лигандомики для каждой отдельной подгруппы.

Таблица 10

Эффективность обогащения клеток.

Доля клеток в процентах дана для каждой фракции до (PreSort) и после магнитной сепарации клеток на основе технологии MACSorting

Р Я	PreSort			Фракция CD45 ⁺			Фракция EpCam ⁺			Фракция EpCam ⁻		
	CD45 ⁺	EpCa ⁺	Жизнеспособность	CD45 ⁺	EpCa ⁺	Жизнеспособность	CD45 ⁺	EpCa ⁺	Жизнеспособность	CD45 ⁺	EpCa ⁺	Жизнеспособность
84	74,7	18,3	80,2	93,5	6,2	71,6	10,7	85,7	88,2	4,5	22,1	64,0
73	23,1	12,3	81,2	7	1,7	77,2	3,4	73,3	87,6	1,7	3,2	87,4
70	76,2	8,83	78,9	96	1,3	82,7	3,4	94	66,4	3,1	4,5	65,4
60	77,4	5,2	92,3	94,8	1,7	90,2	5,2	79,7	88,7	3,8	10,7	89,5
57	31,9	50,5	94,1	93,6	5,0	90,6	1,4	95,3	96,7	0,8	7,2	95,3

Для определения источника каждого идентифицированного HLA-лиганда в общей сложности в пяти образцах ЭРЯ авторы изобретения использовали количественное определение без изотопных меток (репрезентативный пример показан на фиг. 3). Как ожидалось, для идентифицированных на образцах (4/5) ЭРЯ HLA-лигандов, полученных из MUC16, всегда наблюдалась избыточная представленность на обогащенных раковых клетках с 5-кратной медианной избыточной представленностью (диапазон 1,8-135 раз) в зависимости от эффективности обогащения. Данное утверждение также действительно для нескольких других часто презентуемых антигенов из группы TOP100, таких как DDR1, SOX9, CRABP1/2, EYA2, LAMC2, MUC1 или KLK10. Однако для многих других антигенов, в особенности тех, о которых известно, что их уровень повышается под воздействием интерферона, таких как Toll-подобные рецепторы (TLR3, TLR7) или 2'-5'-олигоденилатсинтаза-подобная протеинсинтаза (OASL), невозможно было однозначно показать их презентацию опухолевыми клетками, для них скорее демонстрировалась сильная избыточная представленность на лейкоцитах CD45⁺ и/или клетках стромы. Помимо опухолеассоциированных антигенов, авторы изобретения также выявили лиганды из исходных белков с клеточно-специфической экспрессией. Например, для лигандов, полученных из CD8, CD132 или лимфоцит-специфического белка 1 (LSP1), наблюдалась высокая избыточная представленность на клетках CD45⁺, и для фактора фон Виллебранда (vWF), скорее всего экспрессируемого эндотелиальными клетками в строме, наблюдалась высокая избыточная представленность внутри подгруппы стромальных клеток, подчеркивая правомерность подхода, специфичного для этого вида клеток.

Пример 4. Анализ иммуногенности лигандов, полученных из MUC16.

Для возможности применения пептидных вакцин иммуногенность является основным необходимым условием. В целях оценки иммуногенного потенциала идентифицированных HLA-лигандов авторы изобретения воспользовались протоколом прайминга Т-клеток с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток и Т-клеток, выделенных из крови здоровых доноров. Результаты этого анализа для антигена номер один по рейтингу, ассоциированного с ЭРЯ - MUC16, представлены в табл. 11. Среди 23 различных пептидов, испытанных до сих пор, для 18 наблюдалась иммуногенность в случае по меньшей мере 1/3 доноров. Этот уровень распознавания, составляющий практически 80%, подтверждает присутствие наивных Т-клеток, распознающих MUC16 в популяции клеток человека. Аналогичные результаты были получены для других антигенов из группы TOP100 (например, IDO1, LGALS1).

Таблица 11

Анализ иммуногенности HLA-лигандов из MUC16 /CA-125,
презентируемых в ЭРЯ

HLA	Последовательность	SEQ ID	положительных / исследованных доноров
A*01	STETSTVLY	2	0 / 2
A*02	IITEVITRL	547	3 / 10
A*02	KMISAIPTL	548	4 / 6
A*03	SVLADLVTTK	63	0 / 1
A*11	STSQEIHSATK	62	2 / 6
A*11	GTSGTPVSK	23	0 / 5
A*24	TYSEKTLF	549	2 / 2
A*24	AVTNVRTSI	5	1 / 3
A*25	ETILTFHAF	11	2 / 2
A*25	EVITSSRTTI	13	1 / 1
A*25	EVTSSGRTSI	14	2 / 3
A*25	EVISSRGTSM	12	1 / 3
B*07	SPHPVTALL	48	0 / 1
B*07	SPQNLNRTL	50	1 / 1
B*07	LPHSEITTL	34	0 / 2
B*07	SPSKAFASL	53	2 / 2
B*07	VPRSAATTL	77	1 / 2
B*07	TPGNRAISL	72	2 / 2
B*15	SQGFSHSQM	56	4 / 5
B*15	FQRQGQTAL	18	1 / 6
B*27	ERSPVIQTL	10	1 / 2
B*51	DALVLKTV	7	1 / 3
B*51	DPYKATSAV	8	3 / 3
8 / 10 аллотипов	18/23 HLA-лигандов		34 / 73

Пример 5. Биомаркеры презентации HLA-лигандов.

Антигенспецифическая иммунотерапия рака (например, вакцина на основе пептидов, адоптивный перенос Т-клеток) требует строгого отбора антигенов-кандидатов в ограниченный период времени. Анализ HLA-лиганда, тем не менее, не всегда возможен вследствие недостатка подходящего материала. Осуществимой альтернативой могло бы стать применение биомаркеров для предсказания присутствия HLA-лигандов на опухолевых клетках. В целях оценки того, может ли проанализированная методами иммуногистохимии экспрессия белка (индекс иммунореактивности, IRS) служить суррогатным маркером презентации HLA-лиганда, авторы изобретения проанализировали антигены MUC16 и IDO1 группы TOP100 антигенов МНС I класса, а также антиген MSLN из группы TOP100 антигенов МНС II класса, с помощью методов иммуногистохимии и установили корреляцию между интенсивностью окрашивания (фиг. 4A) и присутствием или отсутствием HLA-лигандов на тех же опухолях. Для обоих белков, MUC16 и MSLN, индекс окрашивания был значимо выше на опухолях, которые презентировали HLA-лиганды из соответствующих исходных белков (фиг. 4C). Это также правомерно для уровней CA-125 в сыворотке, определенных в день хирургической операции (фиг. 4D), указывая на то, что эти параметры могли быть использованы для правильного отбора антигенов-кандидатов для вакцин на основе пептидов. Напротив, IDO1 не демонстрировал значимой ассоциации с презентацией лигандов.

Пример 6. Прогностическая значимость оси MUC16/MSLN.

В связи с их значимостью в качестве мишеней иммунотерапии авторы изобретения хотели оценить, имеют ли MSLN и MUC16 также прогностическую значимость для пациентов, схожих с когортой анализа пептидома. Для этих целей авторы изобретения проанализировали экспрессию обоих антигенов, а также степень инфильтрации Т-клеток с помощью методов иммуногистохимии в тканевой микроматрице (ТМА) образцов серозного рака яичника высокой степени злокачественности (II-III стадии по FIGO). Чтобы избежать прогностически значимые искажающие факторы, авторы изобретения ограничили анализ 71 пациентом с оптимальной циторедукцией рака (остаточная масса менее <1 см).

Тогда как авторами изобретения не наблюдалось никакого прогностического эффекта в случае окрашивания MUC16, сильное окрашивание MSLN ассоциировалось с заметным, с пограничной значимостью ($p=0,0572$), снижением медианной общей выживаемости от 50 до 28 месяцев (фиг. 5A). Несмотря на их различающуюся прогностическую значимость, индексы окрашивания MUC16 и MSLN продемонстрировали прямую и высоко значимую корреляцию (коэффициент корреляции Спирмана $r=0,5237$; 95%

ДИ=0,3159-0,6835, двусторонний уровень значимости $p < 0,001$).

Для оценки инфильтрации Т-клеток авторы изобретения провели оценку ряда CD3 Т-клеток внутриэпителиального компартмента опухоли (CD3E) и фиброваскулярной стромы (CD3S) в отдельности. Примечательно, что лишь ряд эпителиальных Т-клеток демонстрировал значимое ($p < 0,0063$) прогностическое воздействие, тогда как инфильтрация окружающей стромы в отдельности не имела прогностической значимости (фиг. 5B). Только в анализе в подгруппах комбинации окрашивания MSLN и CD3 могла наблюдаться значимая прогностическая польза для опухолей с низким уровнем MSLN и высоким уровнем инфильтрации Т-клеток (фиг. 5C) для обоих CD3E ($p < 0,001$) и CD3S ($p < 0,0049$). Особенно поразительно, что комбинация высокой степени инфильтрации опухоли Т-клетками (CD3E) и низкий уровень окрашивания MSLN определяли подгруппу с долгосрочной выживаемостью при раке (10/11 пациентов с подтвержденной выживаемостью свыше 3 лет).

Цитируемая литература

- Allison, J. P. et al., Science **270** (1995)
 Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012)
 Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006)
 Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001)
 Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001)
 Beggs, J. D., Nature **275** (1978)
 Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995)
 Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003)
 Braumuller, H. et al., Nature (2013)
 Brossart, P. et al., Blood **90** (1997)
 Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004)
 Card, K. F. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004)
 Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. **65** (2004)
 Cohen, C. J. et al., J Mol.Recognit. **16** (2003a)
 Cohen, C. J. et al., J Immunol. **170** (2003b)
 Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972)
 Coligan JE et al., (1995)
 Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006)
 Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006)
 Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003)
 Falk, K. et al., Nature **351** (1991)
 Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001)
 Gabrilovich, D. I. et al., Nat.Med **2** (1996)
 Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. **6** (2006)
 Gnjjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003)
 Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997)
 Green MR et al., **4th**, (2012)
 Greenfield EA, **2nd**, (2014)
 Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007)
 Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987)
 Kibbe AH, **rd**, (2000)
 Krieg, A. M., Nat.Rev.Drug Discov. **5** (2006)
 Liddy, N. et al., Nat.Med. **18** (2012)
 Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med **162** (1985)
 Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993)

- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981)
- Lundblad RL, **3rd**, (2004)
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997)
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006)
- Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997)
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006)
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res. **7** (2008)
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007)
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999)
- Pinheiro J et al., (2015)
- Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995)
- Porta, C. et al., Virology **202** (1994)
- Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics **50** (1999)
- Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006)
- Rock, K. L. et al., Science **249** (1990)
- Rodenko, B. et al., Nat.Protoc. **1** (2006)
- Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988)
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999)
- Sherman F et al., (1986)
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004)
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006)
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008)
- Teufel, R. et al., Cell Mol.Life Sci. **62** (2005)
- Tran, E. et al., Science **344** (2014)
- Walter, S. et al., J.Immunol. **171** (2003)
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012)
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999)
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997)
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, *CA Cancer J. Clin.* **64**, 9-29 (2014).
- Coleman, R.L.*et al Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 211-224 (2013).
- Herzog, T.J. & Pothuri, B.. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**, 604-611 (2006).

- Kandalaf, L.E., Powell, D.J., Jr., Singh, N. & Coukos, G. *J. Clin. Oncol.* **29**, 925-933 (2011).
- Zhang, L., *et al.* *N. Engl. J. Med.* **348**, 203-213 (2003).
- Schlienger, K., *et al.* *Clin. Cancer Res.* **9**, 1517-1527 (2003).
- Matsuzaki, J., *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7875-7880 (2010).
- Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T. & Ioannides, C.G. *J. Exp. Med.* **181**, 2109-2117 (1995).
- Curiel, T.J., *et al.* *Nat. Med.* **10**, 942-949 (2004).
- Vlad, A.M., *et al.* *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 293-301 (2010).
- Hodi, F.S., *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3005-3010 (2008).
- Robert, C., *et al.* *Lancet* **384**, 1109-1117 (2014).
- Volchok, J.D., *et al.* *N. Engl. J. Med.* **369**, 122-133 (2013).
- Rosenberg, S.A., *et al.* *Clin. Cancer Res.* **17**, 4550-4557 (2011).
- Walter, S., *et al.* *Nat. Med.* **18**, 1254-1261 (2012).
- Rosenberg, S.A. *Sci. Transl. Med.* **4**, 127ps128 (2012).
- Tran, E., *et al.* *Science* **344**, 641-645 (2014).
- Mantia-Smaldone, G.M., Corr, B. & Chu, C.S. *Hum. Vaccin. Immunother.* **8**, 1179-1191 (2012).
- Haridas, D., *et al.* *FASEB J.* **28**, 4183-4199 (2014).
- Deng, J., *et al.* *Cancer Metastasis Rev.* **32**, 535-551 (2013).
- Luo, L.Y., *et al.* *Cancer Res.* **63**, 807-811 (2003).
- Uyttenhove, C., *et al.* *Nat. Med.* **9**, 1269-1274 (2003).
- Sorensen, R.B., *et al.* *PLoS One* **4**, e6910 (2009).
- van den Brule, F., *et al.* *Lab. Invest.* **83**, 377-386 (2003).
- Rubinstein, N., *et al.* *Cancer Cell* **5**, 241-251 (2004).
- Perez-Diez, A., *et al.* *Blood* **109**, 5346-5354 (2007).
- Braumuller, H., *et al.* *Nature* **494**, 361-365 (2013).
- Hassan, R. & Ho, M. *Eur. J. Cancer* **44**, 46-53 (2008).
- Schoggins, J.W., *et al.* *Nature* **472**, 481-485 (2011).
- Walter, S., *et al.* *J. Immunol.* **171**, 4974-4978 (2003).
- Couzin-Frankel, J. Cancer immunotherapy. *Science* **342**, 1432-1433 (2013).
- Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. *Nature* **480**, 480-489 (2011).
- Perez, S.A., *et al.* *Cancer* **116**, 2071-2080 (2010).
- Matsushita, H., *et al.* *Nature* **482**, 400-404 (2012).
- Robbins, P.F., *et al.* *Nat. Med.* **19**, 747-752 (2013).
- Gubin, M.M., *et al.* *Nature* **515**, 577-581 (2014).
- Andersen, R.S., *et al.* *Cancer Res.* **72**, 1642-1650 (2012).
- Lu, Y.C., *et al.* *Clin. Cancer Res.* **20**, 3401-3410 (2014).
- Rolland, P., Deen, S., Scott, I., Durrant, L. & Spendlove, I. *Clin. Cancer Res.* **13**, 3591-3596 (2007).
- Cheng, W.F., *et al.* *Br. J. Cancer* **100**, 1144-1153 (2009).
- Berlin, C., *et al.* *Leukemia* (2014).
- Blaustein, A. & Kurman, R.J. *Blaustein's pathology of the female genital tract*, (Springer, New York, NY, 2011).
- Pham, D.L., *et al.* *Int. J. Gynecol. Pathol.* **32**, 358-367 (2013).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 82.
2. Пептид по п.1, где указанный пептид включает непептидные связи.
3. Т-клеточный рецептор, который специфически связывается с HLA-лигандом, где указанный лиганд состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82.
4. Антитело, которое специфически распознает пептид по п.1, связанный с молекулой МНС.
5. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по п.1, связанная с гетерологичной последовательностью промотора.
6. Рекombинантная клетка-хозяин, включающая пептид по п.1 или нуклеиновую кислоту по п.5, где

указанная клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка, или где указанная клетка-хозяин является Т-клеткой или НК-клеткой.

7. Способ получения пептида по п.1, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п.6, которая презентует пептид по п.1, и выделение указанного пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

8. Способ получения активированных Т-лимфоцитов *in vitro*, включающий контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, в течение периода времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антигенспецифическим образом, где указанный антиген является пептидом по п.1.

9. Активированный Т-лимфоцит, полученный способом по п.8, который селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в п.1.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида по п.1, Т-клеточного рецептора по п.3, антитела по п.4, нуклеиновой кислоты по п.5, клетки по п.6 или активированного Т-лимфоцита по п.9, и фармацевтически приемлемый носитель, и дополнительные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и/или стабилизаторы.

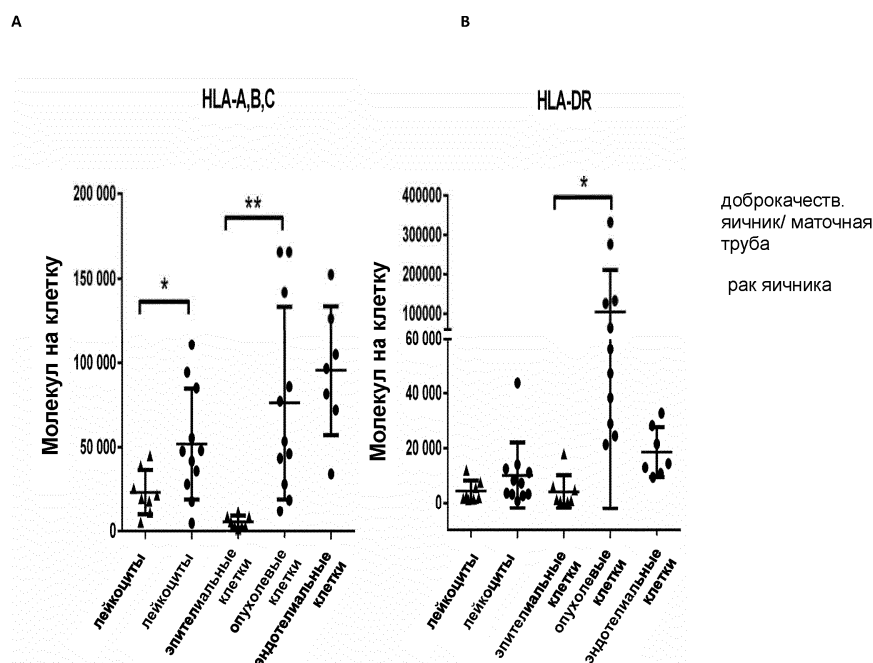
11. Применение пептида по п.1 в диагностике и/или лечении рака.

12. Применение по п.11, где указанный рак выбран из группы: рак яичника, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак почек, рак головного мозга, рак толстой или прямой кишки, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, карцинома клеток Меркеля, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков и другие опухоли, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид в соответствии с SEQ ID NO: 82, в частности рак яичника.

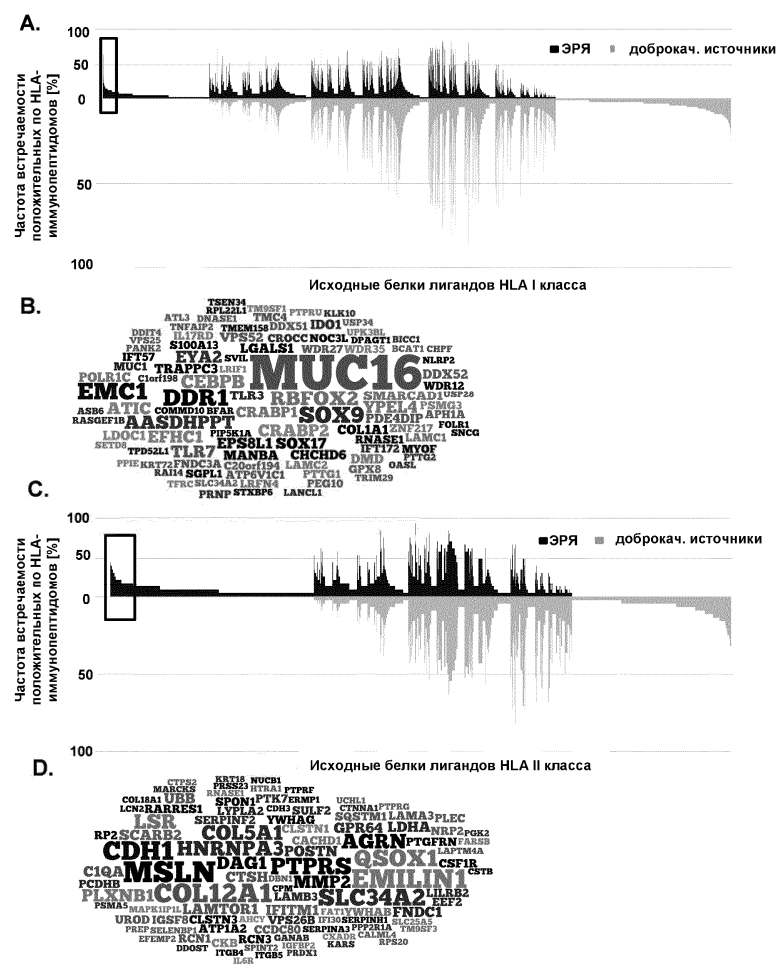
13. Набор для лечения рака, включающий:

(а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид по п.1, Т-клеточный рецептор по п.3, антитело по п.4, нуклеиновую кислоту по п.5, клетку по п.6 или активированный Т-лимфоцит по п.9 в виде раствора или в лиофилизированной форме; и

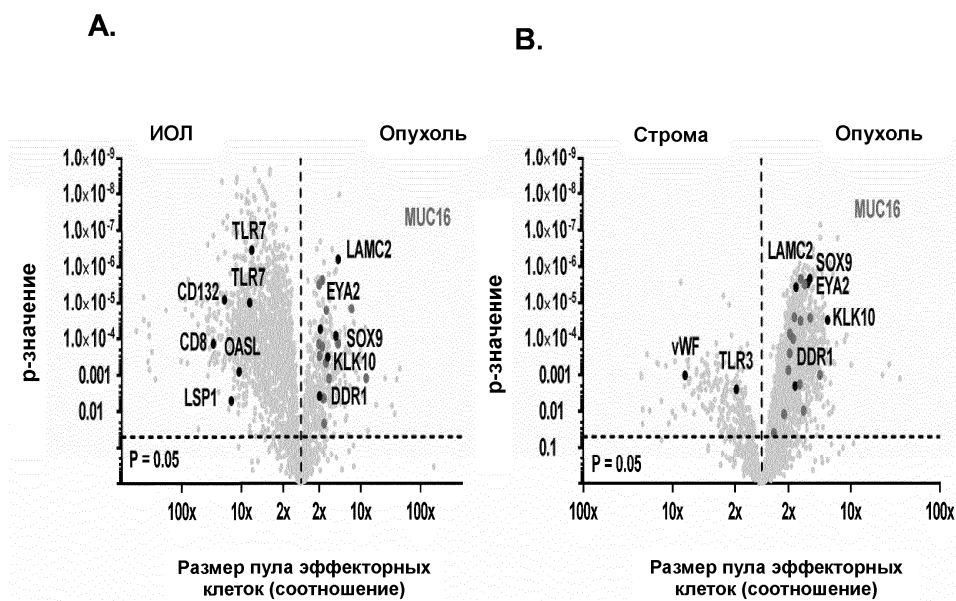
(б) второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава.



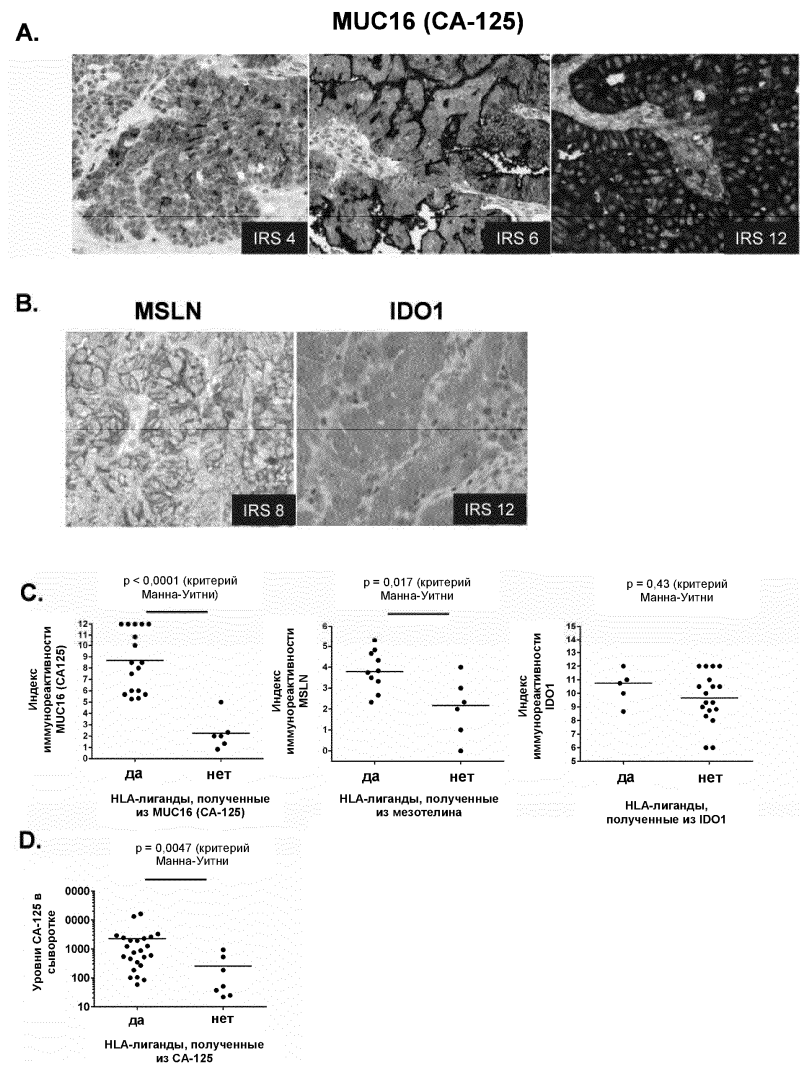
Фиг. 1



Фиг. 2

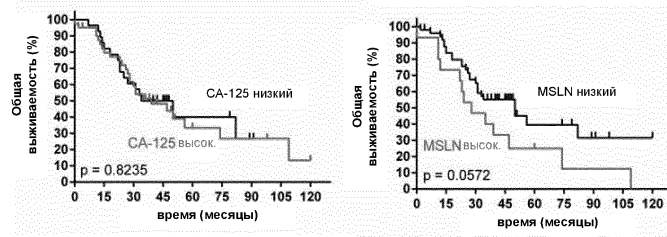


Фиг. 3

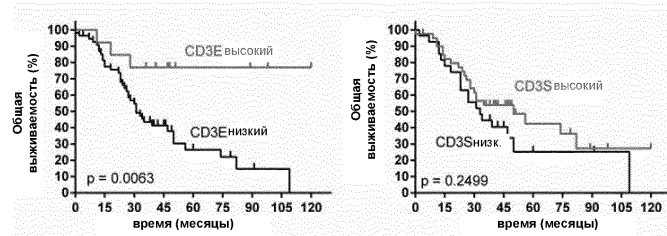


Фиг. 4

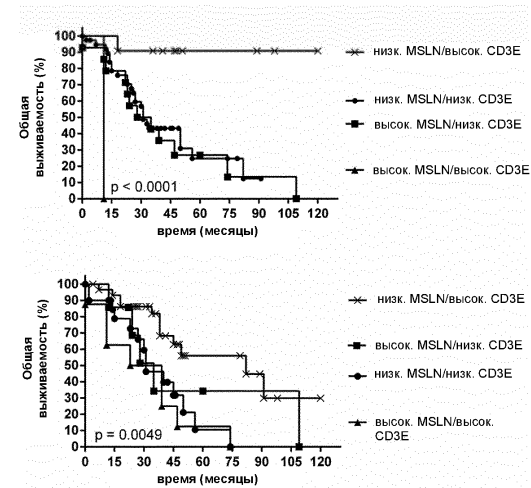
A.



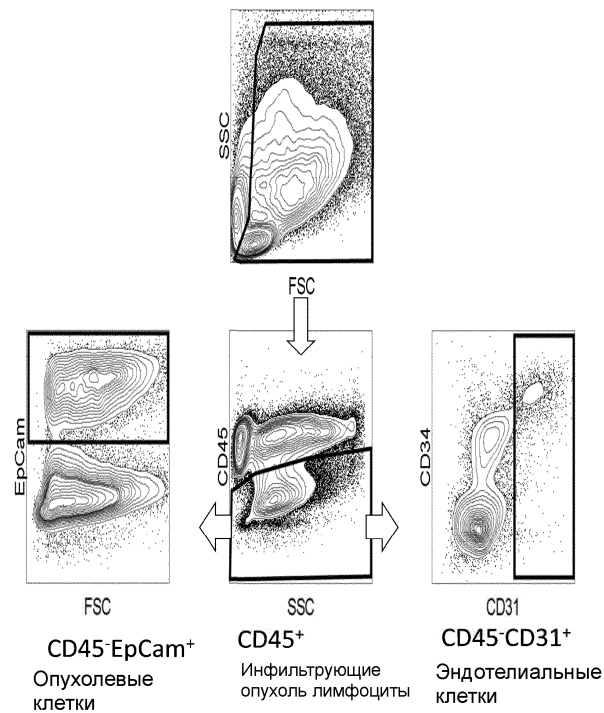
B.



C.



Фиг. 5



Фиг. 6

