

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290170 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.28

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.26

(54) НОВЫЕ РАКОВЫЕ АНТИГЕНЫ И СОПУТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

(31) 19183318.5; 20170163.8

(32) 2019.06.28; 2020.04.17

(33) EP

(86) PCT/GB2020/051557

(87) WO 2020/260897 2020.12.30

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

(72) Изобретатель:
Кассиотис Джордж, Янг Джордж,
Аттиг Ян, Марино Фабио (GB)

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

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

A1

202290170

202290170

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571728EA/061

НОВЫЕ РАКОВЫЕ АНТИГЕНЫ И СОПУТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Известен широкий спектр способов вакцинации. Один хорошо описанный подход включает прямую доставку антигенного полипептида субъекту с целью формирования

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

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

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

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

клеточной терапии для лечения их злокачественного новообразования.

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

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

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

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

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

В WO 2006/103562 описан способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, при котором экспрессируется иммуносупрессивный белок Nr9 из гена env HERV-K. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим нуклеиновую кислоту или антитела, способные ингибировать активность указанного белка, или к иммуногену, или вакцинной композиции, способной вызывать иммунный ответ, направленный против указанного белка.

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

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

Существует необходимость в идентификации дополнительных HERV-ассоциированных антигенных последовательностей, которые можно использовать в иммунотерапии злокачественного новообразования, в частности, меланомы, более

предпочтительно меланомы кожи и увеальной меланомы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы неожиданно открыли, что определенные РНК-транскрипты, которые содержат ДКП-элементы или которые получены из геномных последовательностей, примыкающих к тканевым ДКП-элементам, обнаруживаются на высоких уровнях в клетках меланомы кожи, но не обнаруживаются или обнаруживаются на очень низких уровнях в нормальных, здоровых тканях (см. Пример 1). Такие транскрипты в данном документе называются специфическими для злокачественного новообразования транскриптами, охватывающими ДКП-элемент (CLT). Кроме того, авторы данного изобретения показали, что конкретная потенциальная полипептидная последовательность (то есть открытая рамка считывания (ОРС)), кодируемая одним из этих CLT, транслируется в раковых клетках, процессируется компонентами аппарата процессинга антигена и презентуется на поверхности клеток, обнаруживаемых в опухолевой ткани в ассоциации с молекулами главного комплекса гистосовместимости классов I и II (ГКГС класса I и ГКГС класса II) и человеческих лейкоцитарных антигенов классов I и II (HLA класса I, HLA класса II) (см. Пример 2). Эти данные демонстрируют, что данный полипептид (называемый в данном документе CLT-антигеном) фактически является антигенным. Таким образом, ожидается, что презентация раковых клеток этого CLT-антигена сделает эти клетки восприимчивыми к элиминации Т-клетками, несущими родственные Т-клеточные рецепторы (ТКР) для CLT-антигенов, и способы/схемы вакцинации на основе CLT-антигенов, которые амплифицируют Т-клетки, несущие эти родственные ТКР, как ожидается, будут вызывать иммунные ответы против раковых клеток (и опухолей, содержащих их), особенно меланомы, особенно меланомных опухолях кожи. Т-клетки от субъектов с меланомой действительно реактивны к пептидам, полученным из CLT-антигенов, описанных в данном документе (см. Пример 3). Авторы изобретения подтвердили, что Т-клетки, специфические в отношении CLT-антигенов, не были удалены из репертуара Т-клеток здорового субъекта из-за центральной толерантности (см. Пример 4). Наконец, исследования методом количественной ПЦР-РВ подтвердили, что CLT специфически экспрессируются в РНК, экстрагированной из линий меланомных клеток, по сравнению с линиями немеланомных клеток (см. Пример 5).

Авторы данного изобретения также неожиданно обнаружили, что некоторый CLT, CLT-антиген, а также сверхэкспрессируемый при меланоме кожи, также сверхэкспрессируется в увеальной меланоме. Предполагается, что полипептидная последовательность CLT-антигена, кодируемая этим CLT, будет вызывать иммунные ответы против клеток увеальной меланомы и опухолей, содержащих их.

CLT и CLT-антиген, который является предметом данного изобретения, не является канонической последовательностью, которая может быть легко получена из известных последовательностей генома опухоли, обнаруженных в Атласе ракового генома. CLT представляет собой транскрипт, возникающий в результате сложных событий транскрипции и сплайсинга, управляемых последовательностями регуляции

транскрипции, которые происходят из ЭРВ. Поскольку CLT экспрессируется на высоком уровне и поскольку последовательность полипептида CLT-антигена не является последовательностями белков здорового человека, ожидается, что она будет способна вызывать сильные специфические иммунные ответы и, таким образом, подходят для терапевтического применения в условиях иммунотерапии злокачественного новообразования.

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

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

- последовательности SEQ ID NO. 1 и
- варианта последовательности из (a); и
- (с) иммуногенного фрагмента последовательности из (a);
- (далее упоминается как «полипептид по изобретению»).

Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует

полипептид по изобретению (далее упоминается как «нуклеиновая кислота по изобретению»).

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Спектры пептида SEQ ID NO: 2, полученного из образца опухоли пациента Мел-29. На верхней панели показан выделенный спектр МС/МС (с назначенными ионами фрагментов) пептида, выделенного из образца опухоли пациента, а на нижней панели показана визуализация спектра, демонстрирующая положения линейных пептидных последовательностей, которые были сопоставлены с ионами фрагментов.

Фигура 2. Спектры пептида SEQ ID NO: 2, полученного из образца опухоли пациента Мел-29. На каждой из фигуре показано выравнивание нативного спектра МС/МС пептида, выделенного из образца опухоли пациента, с нативным спектром синтетического пептида, соответствующего той же последовательности.

На Фиг. 3 показаны ответы Т-клеток CD8 от нормального донора крови на рестриктивный HLA-A *03:01 пептид (SEQ ID NO: 6) из CLT-антигена 1.

На Фиг. 4 показаны результаты анализа кПЦР-PB для проверки транскрипции CLT, кодирующего CLT-антиген 1 (SEQ ID NO: 3).

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

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

SEQ ID NO: 2 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 1

SEQ ID NO: 3 представляет собой последовательность кДНК CLT, кодирующую CLT-антиген 1

SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность кДНК, кодирующую CLT-антиген 1

SEQ ID NO: 5 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 1

SEQ ID NO: 6 представляет собой пептидную последовательность, полученную из CLT-антигена 1

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Полипептиды

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

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

Аминокислоты могут называться в данном документе или своими общеизвестными трехбуквенными обозначениями, или однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогично, нуклеотиды могут называться по их обычно принятым однобуквенным кодам.

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

- последовательности SEQ ID NO. 1; и
- варианта последовательности из (a); и
- (с) иммуногенного фрагмента последовательности из (a);

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

- последовательности SEQ ID NO. 1 минус начальный остаток метионина; и
- варианта последовательности из (a); и
- (с) иммуногенного фрагмента последовательности из (a);

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

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

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

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

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

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глютаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);

- 7) серин (S), треонин (T); и
 - 8) цистеин (C), метионин (M)
- (см., например, Creighton, Proteins 1984).

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

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

Варианты полипептидов включают те, в которых аминокислоты были удалены по сравнению с эталонной последовательностью, например, такие делеции могут происходить в 1-10 местах (например, в 1-5 местах, предпочтительно в 1 или 2 местах, в частности в 1 месте) и могут, например, включать делецию 50 или менее аминокислот в каждом месте (например, 20 или менее, в частности 10 или менее, более предпочтительно 5 или менее). Предпочтительно, такие делеции не встречаются в эпитопной области и, следовательно, не оказывают значительного влияния на иммуногенные свойства антигена.

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

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

Иммуногенные фрагменты, как правило, содержат по меньшей мере один эпитоп.

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

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

В результате ключевого участия Т-клеточного ответа в развитии злокачественного новообразования очевидно, что фрагменты полноразмерного полипептида SEQ ID NO: 1, который содержит по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, могут быть иммуногенными и могут способствовать иммунологической защите.

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

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

Если используется отдельный фрагмент полноразмерного полипептида, такой фрагмент считается иммуногенным, если он вызывает ответ, который составляет по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 50% и более предпочтительно по меньшей мере 75% (например, по меньшей мере 90%) активности эталонной последовательности (т.е. последовательности, фрагментом которой является фрагмент), например, активности в анализе *in vitro* повторной стимуляции МКПК или цельной крови с полипептидом в качестве антигена (например, повторная стимуляция в течение периода

от нескольких часов до 1 года, например, до 6 месяцев, от 1 суток до 1 месяца или от 1 до 2 недель), в котором измеряется активация клеток по лимфопротерации (например, протерации Т-клеток), протекции цитокинов (например, ИФН-гамма) в супернатанте культуры (измеряется с помощью ИФА и т. д.), или в котором характеризуются Т-клеточные ответы путем внутри- и внеклеточного окрашивания (например, с использованием антител, специфичных к иммунным маркерам, таким как CD3, CD4, CD8, ИЛ-2, ФНО-альфа, ИФН-гамма, ИФН типа 1, CD40L, CD69 и т. д.) с последующим анализом на проточном цитометре.

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

Пример иммуногенных фрагментов полипептида SEQ ID NO: 1 и, следовательно, примеры пептидов по изобретению, включают полипептиды, которые содержат или состоят из последовательности SEQ ID NO: 2. Другие примеры пептидов по изобретению, включают полипептиды которые содержат или состоят из последовательности SEQ ID NO: 5. Другие примеры пептидов по изобретению, включают полипептиды которые содержат или состоят из последовательности SEQ ID NO: 6. Последовательность SEQ ID NO: 2 была идентифицированы как связанные с молекулами HLA класса I из иммунопептидомного анализа (см. Пример 2). Последовательности SEQ ID NO: 5 и 6 были предсказаны программным обеспечением NetMHC как связанная с молекулами HLA класса I и использовались в иммунологических проверочных анализах (см. Пример 4).

Нуклеиновые кислоты

Изобретение обеспечивает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид по изобретению (называемую нуклеиновой кислотой по изобретению). Например, нуклеиновая кислота изобретения содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3 и 4.

Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной макромолекуле, полученной из нуклеотидных мономеров, в частности дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных мономеров. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные остовные остатки или линкерные группы, которые являются встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые имеют сходные свойства с эталонной нуклеиновой кислотой и которые метаболизируются

аналогично эталонным нуклеотидам или предназначены для продления периода полувыведения из системы. Примеры таких аналогов включают, без ограничений, тиофосфаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК). Предпочтительно, термин «нуклеиновая кислота» относится к встречающимся в природе полимерам дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных мономеров. Предпочтительно, молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению являются рекомбинантными. Рекомбинантный означает, что молекула нуклеиновой кислоты является продуктом по меньшей мере одной из стадий клонирования, рестрикции или лигирования или других процедур, которые приводят к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, встречающейся в природе (например, в случае кДНК). В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по изобретению представляет собой искусственную последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность кДНК или последовательность нуклеиновой кислоты с предпочтением не встречающихся в природе кодонов). В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению представляют собой ДНК. Альтернативно нуклеиновые кислоты по изобретению представляют собой РНК.

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

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по изобретению представляет собой ДНК. Например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3 и 4. Также предоставляется нуклеиновая кислота, которая содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3 или 4, этот вариант кодирует ту же аминокислотную последовательность, но имеет другую нуклеиновую кислоту в зависимости от вырожденности генетического кода.

Таким образом, из-за вырожденности генетического кода каждый отдельно взятый

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

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

Нуклеиновая кислота по данному изобретению, которая содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3 или 4, может содержать несколько скрытых вариантов (например, 1-50, такой как 1-25, в частности, 1-5, и особенно 1 кодон(ы) могут быть изменены) по сравнению с эталонной последовательностью.

Нуклеиновая кислота по данному изобретению может содержать или состоять из последовательности, выбранной из SEQ ID NO. 4 без начального кодона для метионина (т.е. ATG или AUG) или его варианта, как описано выше.

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

Таким образом, нуклеиновая кислота по данному изобретению содержит или состоит из РНК-эквивалента последовательности кДНК, выбранной из SEQ ID NO: 3 или 4, и может содержать несколько скрытых вариантов (например, 1-50, такой как 1-25, в частности, 1-5, и особенно 1 кодон(ы) могут быть изменены) по сравнению с эталонной последовательностью. Под «РНК-эквивалентом» подразумевается последовательность РНК, которая содержит ту же генетическую информацию, что и эталонная

последовательность кДНК (т.е. содержит те же кодоны с рибонуклеотидным остовом вместо дезоксирибонуклеотидного остова и с азотистым основанием урацил (U) в боковой цепи вместо тимина (T)).

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

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

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

Полипептиды и нуклеиновые кислоты

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

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

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

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

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

В целях сравнения двух близкородственных полипептидных или полинуклеотидных последовательностей может быть рассчитан «% идентичности

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

Для сравнения последовательностей одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравниваются исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основании программных параметров.

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

Одним из примеров подходящего алгоритма является PILEUP. Алгоритм PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы связанных последовательностей с использованием прогрессивных парных выравниваний, чтобы

показать взаимосвязь и процент идентичности последовательностей. Он также строит дерево или дендограмму, демонстрирующую отношения кластеризации, используемые для создания выравнивания. Алгоритм PILEUP использует упрощение метода прогрессивного выравнивания Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360. Используемый метод аналогичен методу, описанному Higgins & Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Программа может выравнивать до 300 последовательностей, каждая из которых имеет максимальную длину 5000 нуклеотидов или аминокислот. Процедура множественного выравнивания начинается с попарного выравнивания двух наиболее похожих последовательностей, в результате чего получается кластер из двух выровненных последовательностей. Затем этот кластер выравнивают со следующей наиболее родственной последовательностью или кластером выровненных последовательностей. Для выравнивания двух кластеров последовательностей используют простое расширение метода попарного выравнивания двух отдельных последовательностей. Окончательное выравнивание достигается серией последовательных попарных выравниваний. Программа запускается путем обозначения конкретных последовательностей и их аминокислотных координат для областей сравнения последовательностей и путем обозначения параметров программы. Используя PILEUP, эталонная последовательность сравнивается с другими исследуемыми последовательностями для определения процентного соотношения идентичности последовательностей с использованием следующих параметров: штраф за делецию по умолчанию (3,00), штраф за продолжение делеции по умолчанию (0,10) и штраф за продолжение делеции по умолчанию. PILEUP можно получить из пакета программного обеспечения для анализа последовательностей GCG, например, версии 7.0 (Devereaux et al., 1984, *Nuc. Acids Res.* 12:387-395).

Другим примером алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., 1977, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 and Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (веб-сайт: www.ncbi.nlm.nih.gov/). Данный алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар высококачественных последовательностей (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в искомой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при совмещении со словом той же длины в последовательности базы данных. T называют пороговым показателем сходства соседних слов (Altschul et al. выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как образец для инициации поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный показатель выравнивания можно увеличивать. Совокупные баллы вычисляются с использованием параметров M для нуклеотидных

последовательностей (балл вознаграждения для пары совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей, матрица подсчета баллов используется для расчета совокупного балла. Расширение зачетов слов в каждом направлении прекращает, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от его максимального достигнутого значения; совокупный балл стремится к нулю или ниже, вследствие накопления одного или более отрицательных баллов выравнивания остатков; или в конце каждой последовательности. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP по умолчанию используют длину слова, равную 3, и ожидание (E), равное 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) выравнивания (B), равные 50, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей.

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

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

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

Получение полипептидов по изобретению

Полипептиды по изобретению можно получать и манипулировать ими, используя способы, раскрытые, например, в Green and Sambrook 2012 *Molecular Cloning: A*

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

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

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

Полипептиды также могут быть получены синтетическим путем.

Векторы

В дополнительных вариантах осуществления генетические конструкторы, содержащие одну или более нуклеиновых кислот по изобретению, вводят в клетки *in vivo*, так что полипептид по изобретению продуцируется *in vivo*, вызывая иммунный ответ.

Нуклеиновая кислота (например, ДНК) может присутствовать в любой из множества систем доставки, известных специалистам в данной области техники, включая системы экспрессии нуклеиновых кислот, бактерии и некоторые системы вирусной экспрессии. В данной области техники хорошо известны многочисленные Способы доставки генов, такие как описанные в Rolland, 1998, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, и ссылки, цитируемые в них. Некоторые из этих подходов описаны ниже с целью иллюстрации.

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

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

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

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

промотора, обладают тройной 5'-лидерной последовательностью (TPL), что делает их предпочтительными мРНК для трансляции. Дефицитные по репликации аденовирусы, которые создаются из вирусных геномов, в которых удален один или более ранних генов, особенно полезны, поскольку они имеют ограниченную репликацию и меньшую вероятность распространения патогенов внутри вакцинированного хозяина и контактов с вакцинированным хозяином.

Доставка других полинуклеотидов

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

Доставка РНК

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

стабильности и/или проникновения в клетки *in vitro* или *in vivo*. Множество составов модифицированных (и немодифицированных) РНК были протестированы в качестве вакцин на животных моделях и с участием людей, а многочисленные вакцины на основе РНК используются в текущих клинических исследованиях.

Фармацевтические композиции

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

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

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

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

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

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

Фармацевтически приемлемые соли

Будет очевидно, что композиция по изобретению может содержать фармацевтически приемлемые соли нуклеиновых кислот или полипептидов,

предложенных в данном документе. Такие соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых нетоксичных оснований, включая органические основания (например, соли первичных, вторичных и третичных аминов и основных аминокислот) и неорганические основания (например, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция и магния).

Фармацевтически приемлемые носители

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

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

Иммуностимуляторы

Композиции по изобретению могут также содержать один или более иммуностимуляторов. Иммуностимулятором может быть любое вещество, которое усиливает или потенцирует иммунный ответ (опосредованный антителами и/или клетками) на экзогенный антиген. Примеры иммуностимуляторов, которые часто называют адъювантами в контексте вакцин, включают соли алюминия, такие как гель гидроксида алюминия (квасцы) или фосфат алюминия, сапонины, включая QS21, иммуностимулирующие олигонуклеотиды, такие как CPG, эмульсия типа «масло в воде» (например, когда масло представляет собой сквален), аминокислоты, такие как 4-фосфаты, липополисахарид или его производное, например 3-де-О-ацелированный

монофосфориллипид А (3D-MPL®) и другие лиганды TLR4, лиганды TLR7, лиганды TLR8, лиганды TLR9, ИЛ-12 и интерфероны. Таким образом, предпочтительно один или более иммуностимуляторов композиции по изобретению выбраны из солей алюминия, сапонинов, иммуностимулирующих олигонуклеотидов, эмульсий типа «масло в воде», аминокислот, гликозилированных-4-фосфатов, липополисахаридов и их производных и других лигандов TLR4, лигандов TLR7, лигандов TLR8 и лигандов TLR9. Иммуностимуляторы могут также включать моноклональные антитела, которые специфически взаимодействуют с другими иммунными компонентами, например, моноклональными антителами, которые блокируют взаимодействие рецепторов иммунных контрольных точек, включая PD-1 и CTLA4.

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

Замедленное высвобождение

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

Хранение и упаковка

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

Дозировка

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

Как правило, композиции, содержащие терапевтически или профилактически эффективное количество, доставляют от около 0,1 мкг до около 1000 мкг полипептида по изобретению на введение, более типично от около 2,5 мкг до около 100 мкг полипептида на введение. Если доставляется в форме коротких синтетических длинных пептидов, дозы

могут варьироваться от 1 до 200 мкг/пептид/доза. Что касается полинуклеотидных композиций, они обычно доставляют от около 10 мкг до около 20 мг нуклеиновой кислоты по изобретению на введение, более типично от около 0,1 мг до около 10 мг нуклеиновой кислоты по изобретению на введение.

Заболевания, которые нужно лечить или предотвращать

Как отмечено в другом месте SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептидную последовательность, соответствующую CLT-антигену, которая сверхэкспрессируется при меланоме кожи.

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

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

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

Также обеспечивается применение полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по изобретению для производства лекарственного препарата для применения в формировании иммунного ответа у человека.

Соответственно, иммунный ответ возникает против раковой опухоли, экспрессирующей соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и вариантов, и их иммуногенных фрагментов. Под «соответствующей» в данном контексте подразумевается, что если опухоль экспрессирует SEQ ID NO: 1 или ее вариант или иммуногенный фрагмент, тогда полипептид, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по изобретению и лекарственные препараты, содержащие их, будут основаны на SEQ ID NO: 1 или ее варианте или иммуногенном фрагменте.

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

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

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

Опухоль может представлять собой первичную опухоль или метастатическую опухоль.

Дополнительные аспекты данного изобретения относятся к способу лечения пациента-человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее

иммуногенных фрагментов и вариантов, или профилактики злокачественного новообразования у человека, при котором злокачественное новообразование экспрессирует последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, причем способ включает введение указанному человеку соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по данному изобретению.

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

Транскрипты, соответствующие SEQ ID NO: 3 также были сверхэкспрессированы при увеальной меланоме. Следовательно, в альтернативном варианте реализации, опухоль представляет собой увеальную меланомную опухоль и/или опухоль экспрессирует последовательность SEQ ID NO: 1.

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

последовательности SEQ ID NO. 1; и

варианта последовательности из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательности из (a);

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6, и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

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

Схемы лечения и вакцинации

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

компонент может быть введен в течение нескольких минут (например, во время одного и того же медицинского приема или визита врача) или в течение нескольких часов.

В некоторых вариантах осуществления за «праймированием» или первым введением полипептида, нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению следует одно или более «бустирований» или последующих введений полипептида, нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению (методика «прайм-буст»). В одном варианте осуществления полипептид, нуклеиновая кислота или вектор по изобретению используют в схеме прайм-буст вакцинации. В одном варианте осуществления как праймирование, так и бустирование относятся к полипептиду по изобретению, который представляет собой один и тот же полипептид по изобретению в каждом случае. В одном из вариантов осуществления как праймирование, так и бустирование относится к нуклеиновой кислоте или вектору по изобретению, которые представляют собой одну и ту же нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению. В качестве альтернативы, праймирование можно проводить с использованием нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению, а бустирование можно проводить с использованием полипептида по изобретению, или праймирование можно проводить с использованием полипептида по изобретению, а бустирование можно проводить с использованием нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению. Как правило, за «праймированием» или первым введением примерно через 1-12 недель или 4-6 проводят «бустирование» или второе введение. Последующие введения «бустерных доз» можно проводить каждые 1-6 недель или гораздо позже (до нескольких лет).

Комбинации антигенов

Полипептиды, нуклеиновые кислоты или векторы по изобретению можно использовать в комбинации с одним или более другими полипептидами или нуклеиновыми кислотами, векторами по изобретению и/или другими антигенными полипептидами (или полинуклеотидами или векторами, кодирующими их), которые вызывают формирование иммунного ответа против меланомы, например, меланомы кожи или увеальной меланомы. Эти другие антигенные полипептиды могут быть получены из различных источников, они могут включать хорошо описанные ассоциированные с меланомой антигены, такие как GPR143, PRAME, MAGE-A3 или pMel (gp100). В качестве альтернативы они могут включать другие типы меланомных антигенов, включая специфические для пациента неоантигены (Lauss et al. (2017). *Nature Communications*, 8(1), 1738. <http://doi.org/10.1038/s41467-017-01460-0>), неоантигены с сохраненным интроном (Smart et al. (2018). *Nature Biotechnology*. <http://doi.org/10.1038/nbt.4239>), сплайсированные варианты неоантигенов (Hoyos et al., *Cancer Cell*, 34(2), 181-183. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.008>; Kahles et al. (2018). *Cancer Cell*, 34(2), 211-224.e6. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.001>), меланомные антигены, которые подпадают под категорию, известную как антигены, кодирующие Т-клеточные эпитопы, связанные с нарушенным процессингом пептидов (TIEPP; Gigoux, M., & Wolchok, J. (2018). *JEM*, 215, 2233, Marijt et al. (2018). *JEM* 215, 2325), или неоантигены, которые будут открыты

(включая CLT-антигены). Кроме того, антигенные пептиды из этих различных источников также можно комбинировать с (i) неспецифическими видами иммуностимуляторов/адъювантов и/или (ii) антигенами, например, содержащими универсальные эпитопы CD4 хелперов, которые, как известно, активируют сильные CD4 Т-хелперы (доставляемые в виде полипептидов, или в виде полинуклеотидов, или векторов, кодирующих эти антигены CD4), для усиления антимеланомных специфических ответов, вызываемых совместно вводимыми антигенами.

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

Могут быть предоставлены нуклеиновые кислоты, кодирующие вышеупомянутые слитые белки.

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

- (1) в виде двух или более отдельных антигенных полипептидных компонентов;
- (2) в виде слитого белка, содержащего оба (или дополнительные) полипептидных компонента;
- (3) в виде одного или более полипептидов и одного или более полинуклеотидных компонентов;
- (4) в виде двух или более отдельных полинуклеотидных компонентов;
- (5) в виде одного полинуклеотида, кодирующего два или более отдельных полипептидных компонента; или
- (6) в виде одного полинуклеотида, кодирующего слитый белок, содержащий оба (или дополнительные) полипептидных компонента.

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

Слитые белки

В качестве варианта осуществления приведенного выше обсуждения комбинаций антигенов в изобретении также предложен выделенный полипептид по изобретению, слитый со вторым или дополнительным полипептидом по изобретению (далее «комбинированный полипептид по изобретению»), путем создания конструкторов нуклеиновых кислот, в которых слиты последовательности, кодирующие отдельные антигены. Ожидается, что комбинированные полипептиды по изобретению будут иметь полезные свойства, описанные в данном документе для полипептидов по изобретению, и

могут иметь преимущество в виде превосходной иммуногенной или вакцинной активности, профилактического или терапевтического эффекта (включая увеличение широты и глубины ответов), и могут быть особенно ценными для аутбредной популяции. Гибриды полипептидов по изобретению могут также обеспечить преимущество в повышении эффективности конструирования и производства вакцинных антигенов и/или векторных вакцин (включая вакцины на основе нуклеиновых кислот).

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

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

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

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

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

Полипептиды, связывающие CLT-антигены

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

Антигенсвязывающие полипептиды могут быть получены способами, хорошо известными специалисту. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомной технологии путем слияния В-клетки, продуцирующей

специфические антитела, с миеломной клеткой (злокачественное В-клеточное новообразование), выбранной по способности расти в культуре тканей и отсутствию синтеза цепей антител (Köhler and Milstein, 1975, Nature 256(5517): 495-497 и Nelson et al., 2000 (Jun), Mol Pathol. 53(3):111-7, полностью включенные в данный документ посредством ссылки).

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

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

б) культивирования полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и выделения клеток, продуцирующих антитела, имеющие желаемую специфичность.

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

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

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

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

д) выделение антител, имеющих желаемую специфичность

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

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

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

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

Другой важный класс антигенсвязывающих полипептидов включает молекулы, полученные из Т-клеточного рецептора (ТКР), которые связываются с представляемыми

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

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

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

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

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

В данном изобретении предлагается способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или для профилактики злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, что включает введение указанному человеку антигенсвязывающего полипептида или композиции, содержащей указанный антигенсвязывающий полипептид по данному изобретению.

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

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

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

- (a) последовательности SEQ ID NO: 1; и
- (b) варианта последовательности из (a); и
- (c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a);

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6, и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

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

Клеточная терапия для облегчения презентации антигена in vivo

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

В определенных предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения в качестве АПК используются дендритные клетки или их предшественники. Таким образом, в одном варианте осуществления АПК по изобретению представляет собой дендритную клетку. Дендритные клетки представляют собой высокоэффективными АПК (Banchereau & Steinman, 1998, Nature, 392:245-251), и было показано, что они эффективны в качестве физиологического адьюванта для выработки профилактического или терапевтического иммунитета (см. Timmerman & Levy, 1999, Ann. Rev. Med. 50:507-529). В общем, дендритные клетки можно идентифицировать на основе их типичной формы (звездчатые in situ, с заметными цитоплазматическими процессами (дендритами), видимыми in vitro), их способности захватывать, процессировать и презентовать антигены с высокой эффективностью и их способности активировать ответы наивных Т-клеток.

Конечно, дендритные клетки могут быть сконструированы для экспрессии специфических рецепторов клеточной поверхности или лигандов, которые, как правило, не обнаруживаются на дендритных клетках *in vivo* или *ex vivo*, и такие модифицированные дендритные клетки рассматриваются в настоящем изобретении. В качестве альтернативы дендритным клеткам в составе иммуногенной композиции можно использовать секретируемые везикулы, нагруженные антигеном, (так называемые экзосомы) (см. Zitvogel et al., 1998, *Nature Med.* 4:594-600). Таким образом, в варианте осуществления предложена экзосома, нагруженная полипептидом по изобретению.

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

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

АПК также могут быть генетически модифицированы, например, трансфицированы полинуклеотидом, кодирующим белок (или его часть или другой вариант), таким образом, что полипептид экспрессируется на поверхности клетки. Такая трансфекция может осуществляться *ex vivo*, и затем можно использовать фармацевтическую композицию, содержащую такие трансфицированные клетки, как описано в данном документе. Альтернативно, пациенту может быть введен носитель для доставки гена, который нацелен на дендритную или другую антигенпрезентирующую клетку, что приводит к трансфекции, которая происходит *in vivo*. Например, трансфекцию дендритных клеток *in vivo* и *ex vivo* обычно можно проводить с использованием любых методов, известных в данной области техники, таких как методы, описанные в WO 97/24447, или метода генной пушки, описанного Mahvi et al., 1997, *Immunology and Cell Biology* 75:456-460. Загрузка антигеном дендритных клеток может быть достигнута путем

инкубации дендритных клеток или клеток-предшественников с полипептидом, ДНК (например, плазмидным вектором) или РНК; или с рекомбинантными бактериями или вирусами, экспрессирующими антиген, (например, аденовирусом, аденоассоциированным вирусом (AAB) (например, AAV типа 5 и типа 2), альфавирусом (например, вирусом венесуэльского конского энцефалита (VEEV), вирусом Синдбис (SIN), вирусом леса Семлики (SFV), вирусом герпеса, аренавирусом (например, вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV)), вирусом кори, поксвирусом (например, модифицированным вирусом осповакцины Анкара (MVA) или вирусом оспы птиц), парамиксовирусом, лентивирусом или рабдовирусом (например, вирусом везикулярного стоматита (VSV)). Перед загрузкой полипептида, полипептиды могут быть ковалентно конъюгированы с иммунологическим партнером, который оказывает помощь Т-клеткам (например, с молекулой-носителем). Альтернативно, дендритная клетка может активироваться неконъюгированным иммунологическим партнером, отдельно или в присутствии полипептида или вектора.

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

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

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

Также предлагается способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или для профилактики злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, что включает введение указанному человеку указанной антигенпрезентирующей клетки по данному изобретению, которая подходящим образом является дендритной клеткой или композицией, содержащей указанную антигенпрезентирующую клетку по данному изобретению.

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

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

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

Также предлагается способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или для профилактики злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, что включает введение указанному человеку указанной экзосомы по данному изобретению, или композиции, содержащей указанную экзосому по данному изобретению.

В одном варианте реализации предложена экзосома по данному изобретению или композиция, содержащая указанную экзосому по данному изобретению, для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и их иммуногенные фрагменты.

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

Терапия стимулированными Т-клетками

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

Для успешной активации Т-клеток необходимо связывание костимулирующих поверхностных молекул B7 и CD28 с антигенпрезентирующими клетками и Т-клетками, соответственно (сигнал 2). Для достижения оптимальной активации Т-клеток требуются

оба сигнала 1 и 2. И наоборот, стимуляция антигенным пептидом (сигнал 1) в отсутствие костимуляции (сигнал 2) не может вызвать полную активацию Т-клеток и может привести к Т-клеточной толерантности. Помимо костимулирующих молекул, существуют также ингибирующие молекулы, такие как CTLA-4 и PD-1, которые индуцируют сигналы для предотвращения активации Т-клеток.

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

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

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

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

В одном варианте осуществления предложен способ получения популяции Т-клеток, цитотоксичных для раковых клеток, экспрессирующих последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, который включает (а) получение Т-клеток, и антигенпрезентирующих клеток от пациента со злокачественным новообразованием и (ii) стимуляцию и амплификацию популяции Т-клеток *ex vivo* с помощью соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по данному изобретению.

Под «соответствующими» в данном контексте подразумевается, что если раковые клетки экспрессируют SEQ ID NO: 1 или ее вариант или иммуногенный фрагмент, тогда популяция Т-клеток стимулируется и амплифицируется *ex vivo* с помощью SEQ ID NO: 1

или ее вариант или иммуногенный фрагмент в форме полипептида, нуклеиновой кислоты или вектора, или композиции, содержащей одно из вышеперечисленного.

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

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

В одном варианте осуществления предложена клетка, которая представляет собой Т-клетку, которая была стимулирована полипептидом, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по изобретению (далее Т-клетка по изобретению).

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

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

Также предлагается способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или для профилактики злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, что включает введение указанному человеку указанной популяции Т-клеток или Т-клетки по данному изобретению, или композиции, содержащей указанную популяцию Т-клеток или Т-клетку по данному изобретению.

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

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

- (a) последовательности SEQ ID NO: 1; и
- (b) варианта последовательности из (a); и

(с) иммуногенного фрагмента последовательности из (а);

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6, и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

Терапия сконструированными иммунными клетками

Производные всех типов полипептидов, связывающих CLT-антигены, описанных выше, включая ТКР или миметики ТКР (см. Dubrovsky et al., 2016, Oncoimmunology), которые распознают пептиды, производные от CLT-антигена, в комплексе с молекулами HLA человека, могут быть сконструированы для экспрессии на поверхности Т-клеток (аутологичных или неаутологичных), которые затем можно применять в качестве адоптивной Т-клеточной терапии для лечения злокачественного новообразования.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Предложен способ лечения пациента-человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или профилактики злокачественного новообразования у человека, при котором злокачественное новообразование экспрессирует последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее

иммуногенных фрагментов и вариантов, при этом способ включает введение указанному человеку цитотоксической клетки по данному изобретению, которая обычно является Т-клеткой.

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

Комбинированные терапии

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

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

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

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

Таким образом, аспект изобретения включает введение полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора, антигенсвязывающего полипептида, композиции, Т-клетки, популяции Т-клеток или антигенпрезентирующей клетки по настоящему изобретению в комбинации с ингибитором контрольной точки. Примеры ингибиторов контрольной точки выбран из

ингибиторов PD-1, таких как пембролизумаб (Keytruda) и ниволумаб (Opdivo), ингибиторов PD-L1, таких как атезолизумаб (Tecentriq), авелумаб (Bavencio) и дурвалумаб (Imfinzi) и ингибиторы CTLA-4, такие как ипилимумаб (Yervoy).

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

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

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

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

Диагностирование

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

Также данное изобретение перелагает способ диагностики у человека, страдающего от злокачественного новообразования, включающий стадии: определения, экспрессируют ли указанные раковые клетки последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и ее иммуногенных фрагментов или вариантов (например, последовательность любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6); или нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность указанного полипептида (например, выбранную из последовательностей SEQ ID NO: 3 и 4), и диагностирование у указанного человека злокачественного новообразования, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируются в указанных раковых клетках.

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

В данном изобретении предложен способ диагностирования того, что человек страдает от злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, включающий стадии: определения того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную

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

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

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

(а) определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и ее иммуногенных фрагментов или вариантов (например, последовательность любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6) или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид (например, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 3 и 4); и если это так

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

Также предложено применение полипептида, содержащего последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO. 1; или

варианта последовательностей из (а); и

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

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

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

- (a) последовательности SEQ ID NO: 1; и
- (b) варианта последовательностей из (a); и
- (c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a).

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6, и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

Соответственно, полипептид по данному изобретению имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 или ее фрагментов, таких как ее иммуногенные фрагменты (например, последовательность любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6).

Соответственно, нуклеиновая кислота по данному изобретению имеет или содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 3 и 4.

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

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

Полипептиды по изобретению могут быть обнаружены с помощью антигенспецифических антител в анализе типа ИФА для обнаружения полипептидов по

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

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

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

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

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

Если полипептид по данному изобретению с SEQ ID NO: 1 или его фрагмент, обнаружены, тогда злокачественное новообразование может представлять собой меланому кожи или увеальную меланому.

Конкретные варианты осуществления изобретения

В одном варианте осуществления полипептид CLT-антигена содержит или состоит из SEQ ID NO: 1. Иллюстративные фрагменты содержат или состоят из любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанную полипептидную последовательность, содержат или состоят из SEQ ID NO: 3 или 4. Предложены соответствующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды, антигенпрезентирующие клетки и экзосомы, как описано выше. Указанные нуклеиновые кислоты (например, ДНК или РНК), Т-клетки, популяции Т-клеток, цитотоксические клетки, антигенсвязывающие полипептиды,

антигенпрезентирующие клетки и экзосомы могут использоваться при лечении злокачественного новообразования, особенно меланомы, например, меланомы кожи или увеальной меланомы. Также предложены связанные способы диагностирования.

Примеры

Пример 1. Идентификация CLT

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

В качестве первого шага мы *de novo* собрали комплексный пан-раковый транскриптом. Для достижения этого прочтения последовательностей РНК от 768 образцов пациентов, полученных из проекта Атласа ракового генома (TCGA) для представления широкого спектра типов злокачественных новообразований (24 сбалансированных в гендерном отношении образца от каждого из 32 типов злокачественных новообразований (31 первичная и 1 метастатическая меланوما); таблица S1), были использованы для направляемой геномом сборки. Сбалансированные в гендерном отношении образцы (за исключением гендер-специфических тканей) были обрезаны по адаптеру и качеству (Q20) и отфильтрованы по длине (оба прочтения пары ≥ 35 нуклеотидов) с использованием программы cutadapt (v1.13) (Marcel M., 2011, EMBnet J., 17:3) и нормированы по к-меру ($k=20$) с использованием к-меров (v2.0) (Crusoe et al., 2015, F1000Res., 4:900) для максимальной и минимальной глубины 200 и 3, соответственно. Считывания были сопоставлены с GRCh38 с помощью STAR (2.5.2b) с настройками, идентичными тем, которые используются в TCGA, и переданы в Trinity (v2.2.0) (Trinity, Grabherr, M.G., et al., 2011, Nat. Biotechnol., 29:644-52) для сборки под геномом с отключенной встроенной нормализацией глубины *in silico*. Большинство способов сборки было выполнено на 32-ядерных узлах высокопроизводительной вычислительной системы с 256 ГБ ОЗУ, при этом неудавшиеся процессы повторно запускались с использованием узлов с 1,5 ТБ ОЗУ. Полученные контиги были подвергнуты поли(А)-триммированию (trimpoly в SeqClean v110222) и энтропийной фильтрации ($\geq 0,7$) для удаления некачественных и артефактных контигов (bbduk в BBMap v36.2). Для каждого типа злокачественного новообразования исходные 24 образца были квази-картированы на очищенную сборку с использованием Salmon (v0.8.2 или v0.9.2) (Patro, R., et al., 2017, Nat. Methods, 14:417-419), с обнаруженными контигами, экспрессируемыми при удалении $< 0,1$ транскриптов на миллион (TPM). Оставшиеся были картированы на GRCh38 с использованием GMAP (v161107) (Wu et al., 2005, Bioinf., 21:1859-1875), и контиги, которые не были выровнены с $\geq 85\%$ идентичности, более $\geq 85\%$ их длины были удалены из сборки. Наконец, сборки для всех типов злокачественного новообразования вместе были упорядочены и объединены в самые длинные непрерывные транскрипты с использованием gffread (Cufflinks v2.2.1) (Trapnell et al., 2010, Nat. Biotech., 28:511-515). Поскольку этот способ сборки был специально разработан для оценки повторяющихся элементов, моноэкзонные транскрипты были сохранены, но помечены.

Полноту и качество сборки транскриптов оценивали путем сравнения с GENCODE v24basic и MiTranscriptome1 (Iyer et al. 2015, Nat. Genet., 47: 199-208). Мы составили перечень уникальных сайтов сплайсинга, представленных в GENCODE, и проверили, присутствует ли сайт сплайсинга в сборке транскриптома в пределах 2-нуклеотидного окна отсрочки. Этот способ привел к идентификации 1001931 транскрипта, 771006 из которых были сплайсированы и 230925 моноэкзонных.

Отдельно на собранные контиги накладывали на аннотацию последовательности геномных повторов для идентификации транскриптов, содержащих ДКП-элемент. ДКП-элементы и не-ДКП-элементы были аннотированы, как описано ранее (Attig et al., 2017, Front. In Microbiol., 8:2489). Вкратце, скрытые модели Маркова (HMM), представляющие известные семейства человеческих повторов (библиотека Dfam 2.0 v150923), были использованы для аннотирования GRCh38 с помощью RepeatMasker Open-3.0 (Smit, A., R. Hubley, and P. Green, <http://www.repeatmasker.org>, 1996-2010), сконфигурированного с помощью nhmmer (Wheeler et al., 2013, Bioinform., 29:2487-2489). Сканирование на основе HMM повышает точность аннотации по сравнению со способами на основе BLAST (Hubley et al., 2016, Nuc. Acid. Res., 44:81-89). RepeatMasker аннотирует ДКП и внутренние области отдельно, поэтому табличные выходные данные были проанализированы для объединения смежных аннотаций для одного и того же элемента. Этот способ дал 181967 транскриптов, которые содержали один или более, полный или частичный ДКП-элемент.

Транскрипты на миллион (TPM) определяли для всех транскриптов с использованием Salmon, а экспрессию в пределах каждого типа злокачественного новообразования сравнивали с экспрессией в 811 образцах здоровой ткани (контрольные образцы здоровой ткани для всех типов злокачественного новообразования, если таковые имеются, от TCGA и, отдельно от GTEx (The Genotype-Tissue Expression Consortium, 2015, Science, 348:648-60). Считалось, что транскрипты экспрессируются при злокачественном новообразовании, если обнаружено более 1 TPM в любом образце, и как специфические для злокачественного новообразования, если выполнялись следующие критерии: i, экспрессировались в ≥ 6 из 24 образцов каждого типа злокачественного новообразования; ii, экспрессировались при < 10 TPM в $\geq 90\%$ всех образцов здоровой ткани; iii, экспрессировались при представляющем интерес типе злокачественного новообразования в $\geq 3 \times$ медианы экспрессии для любого типа контрольной ткани; и iv, экспрессировались при представляющем интерес типе злокачественного новообразования $\geq 3 \times$ 90-го перцентиля для соответствующей здоровой ткани, если таковой имеется.

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

Дальнейшее курирование проводили на 403 CLT, специфически экспрессируемых в меланоме, чтобы исключить потенциально неправильно собранные контиги и контиги,

соответствующие сборке клеточных генов. Дополнительная оценка в ручную была проведена, чтобы убедиться, что образцы сплайсинга подтверждаются исходными считываниями РНК-секвенирования. CLT были дополнительно оценены таким образом, что те, у которых медиана экспрессии в любой нормальной ткани GTEx превышала 1 TPM, были отброшены.

Из 403 CLT для кожной меланомы через эти фильтры прошли 97 CLT.

Пример 2. Иммунопептидомный анализ

Иммунопептидомный анализ на основе масс-спектрометрии (МС) представляет собой мощную технологию, которая позволяет напрямую обнаруживать специфические пептиды, связанные с молекулами HLA (HLA_p) и присутствующие на поверхности клетки. Методика заключается в аффинной очистке HLA_p из биологических образцов, таких как клетки или ткани, путем захвата антителами к HLA. Выделенные молекулы HLA и связанные пептиды затем отделяются друг от друга, и элюированные пептиды анализируются с помощью нано-ультра жидкостной хроматографии высокого разрешения в сочетании с масс-спектрометрией (нУВЭЖХ-МС) (Freudenmann et al., 2018, Immunology 154(3):331-345). В масс-спектрометре определенные пептиды с определенным отношением заряда к массе (m/z) выбираются, выделяются, фрагментируются и затем подвергаются второму раунду масс-спектрометрии (МС/МС), чтобы выявить m/z образующихся фрагментных ионов. Затем можно изучить спектры фрагментации (МС/МС), чтобы точно идентифицировать аминокислотную последовательность выбранного пептида, которая привела к детектированным ионам фрагмента.

Интерпретация спектров МС/МС и последующая идентификация пептидных последовательностей основаны на совпадении экспериментальных данных и теоретических спектров, созданных на основе пептидных последовательностей, включенных в справочную базу данных. Хотя можно искать данные МС, используя заранее определенные списки, соответствующие всем открытым рамкам считывания (OPC), полученным из известного транскриптома, или даже всего генома (Nesvizhskii et al., 2014, Nat. Methods 11: 1114-1125), использование этих очень больших баз данных последовательностей приводит к очень высоким показателям ложного обнаружения (FDR), которые ограничивают идентификацию представленных пептидов. Дополнительные технические вопросы (например, масса лейцина=масса изолейцина) и теоретические вопросы (например, сплайсинг пептидов (Liere, et al., 2016, Science 354(6310): 354-358)) увеличивают ограничения, связанные с использованием очень больших баз данных, таких как базы данных известного транскриптома или всего генома. Таким образом, на практике исключительно сложно выполнить точный иммунопептидомный анализ для идентификации новых антигенов без ссылки на четко определенный набор потенциальных полипептидных последовательностей (Li, et al., 2016, BMC Genomics 17 (Suppl 13):1031).

Таким образом, мы создали базу данных всех предсказанных полипептидных последовательностей (OPC) из ≥ 10 остатков из 97 CLT кожной меланомы из Примера 1.

Это привело к 2269 OPC длиной от 10 до 207 аминокислот.

Bassani-Sternberg et al. (Bassani-Sternberg et al., 2016, Nature Commun., 7: 13404; ссылка на базу данных: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894>) сравнили данные MC/MC, собранные из образцов HLA-связанных пептидов, полученных от 25 пациентов с меланомой кожи, с полипептидными последовательностями, сообщенными для всего протеома человека. Эти анализы выявили сотни тысяч пептидов, соответствующих известным белкам человека. Как и ожидалось, эти пептиды включали пептиды, обнаруженные в составе множества опухолеассоциированных антигенов (ТАА), включая PRAME, MAGEA3 и TRPM1 (меластатин).

Применяя подробные знания об оценке иммунопептидомики, изобретатели изучили спектры из набора данных PXD004894 HLA Класс I со всеми полипептидными последовательностями, обнаруженными в протеоме человека (UniProt), с использованием программного обеспечения PEAKSTM (v8.5 и vX, Bioinformatics Solutions Inc). Поскольку большинство HLA-связанных пептидов класса I, обнаруженных в клетках, происходят из конститутивно экспрессируемых белков, одновременное изучение этих баз данных с протеомом UniProt помогает убедиться в правильности отнесения наших последовательностей OPC CLT к спектрам MC/MC. Программное обеспечение PEAKS, как и другое программное обеспечение для изучения MC/MC, присваивает значение вероятности ($-10\lg P$; см. Таблицу 1) каждому определению спектров для количественной оценки определения.

Результаты этих исследований выявили >50 индивидуальные пептиды, которые были связаны с молекулами HLA Класса I, иммуноосажденными из образцов опухолей 25 пациентов, Bassani-Sternberg et al., которые соответствовали аминокислотным последовательностям OPC, полученным из CLT, и НЕ соответствуют полипептидным последовательностям, присутствующим в известном протеоме человека (UniProt).

Дальнейшая оценка в ручную пептидных спектров, определенных программным обеспечением PEAKS, была использована для подтверждения отнесения спектров к пептидам, которые были картированы на OPC, полученных из CLT и, таким образом, определены как антигены CLT. Один пептид, который неоднократно наблюдался в наборе данных MC/MC Bassani-Sternberg, сопоставлен с ORF с 45 кодонами, определяемый как CLT-антиген 1 (Таблица 1; SEQ ID NO: 1).

Повторное обнаружение этих пептидов, связанных с молекулами HLA класса I, демонстрирует, что CLT-антиген 1 (SEQ ID NO: 1) транслируется в тканях меланомы, обрабатывается по пути HLA класса I и, наконец, представляется иммунной системе в комплексе с молекулами HLA класса I. В таблице 1 показаны свойства пептидов, обнаруженных у трех пациентов, которые были сопоставлены с этим CLT-антигеном. На Фиг. 1 показаны репрезентативные спектры MC/MC от одного образца пациента, который содержал пептид, показанный в Таблице 1. На верхней панели на фиг. 1 показан профиль пептидного фрагмента MC/MC со стандартными аннотациями MC/MC (b: N-концевой ионный фрагмент; y: C-концевой фрагмент иона; $-H_2O$: потеря воды; $-NH_3$: потеря

аммония; [2+]: двухзарядный ион пептида; пре: нефрагментированный пептидный ион-предшественник; a_n-n: ион внутреннего фрагмента). На Фиг. 1 на приведенной выше панели показан экстракт пиков наиболее распространенных ионных фрагментов, присвоенных программным обеспечением PEAKS и полученных из базы данных PRIDE (Bassani-Sternberg et al., 2016, Nature Commun., 7: 13404; ссылка на базу данных: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894>). На нижней панели на фиг. 1 показано отображение спектра, указывающего положения линейных пептидных последовательностей, которые были сопоставлены с ионами фрагментов. В соответствии с высокими оценками -10lgP, присвоенными пептиду в таблице 1, этот спектр содержит многочисленные фрагменты, которые точно соответствуют последовательности пептида (SEQ ID NO: 2), которые были обнаружены в этих анализах.

Пептид, обнаруженный в связи с молекулами HLA класса I в таблице 1, был оценен для определения его прогнозируемой силы связывания с типами A и B пациента HLA класса I с использованием программного обеспечения для прогнозирования NetMHCpan 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>). Результаты этих предсказательных исследований показывают, что пептид проявлял сильное связывание с аллелем HLA I B07:02, который был обнаружен у обоих типизированных пациентов (см. Таблицу 2). Тот факт, что пептид, производный от антигена CLT, предположительно связывается с одним из аллелей HLA, обнаруженных у каждого из типизированных пациентов, согласуется с их обнаружением.

Чтобы обеспечить дополнительную уверенность в отнесении спектров МС, полученных из опухолевой ткани, к пептидной последовательности, которую мы обнаружили, пептид с этой обнаруженной последовательностью был синтезирован и подвергнут nUPLC-MS² в тех же условиях, которые применялись к образцам опухоли в исходном исследовании (Bassani-Sternberg et al., 2016, Nature Commun., 7: 13404). Сравнение спектров этого синтетического пептида с выбранным эндогенным пептидом показано на фиг. 2. На этой фигуре верхний спектр соответствует образцу опухоли (из базы данных PRIDE (Bassani-Sternberg et al., 2016, Nature Commun., 7: 13404; ссылка на базу данных: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894>, а нижний спектр соответствует синтетически полученному пептиду с той же последовательностью. Выбранные значения m/z обнаруженных ионных фрагментов показаны над/под каждым пиком фрагмента в этих спектрах МС/МС. На этой фигуре показано точное выравнивание фрагментов (крошечные различия в экспериментально определенных значениях m/z между ионами фрагментов опухолевого и синтетического пептида находятся в пределах принятого фрагментарного допуска <0,05 Дальтон), подтверждая правдивость соотнесения спектра, полученного из опухолевой ткани, пептиду, кодируемого CLT.

Взятые вместе, данные, представленные в таблицах 1 и 2 и на фигурах 1-2, обеспечивают исключительно сильную поддержку трансляции, процессинга и презентации соответствующего CLT-антигена у пациентов с меланомой.

Для дополнительно подтверждения специфичности CLT к злокачественному

новообразованию авторы данного изобретения обработали 37 образцов нормальной ткани (10 нормальных образцов тканей кожи, 9 нормальных образцов тканей легкого и 18 нормальных образцов тканей груди) и подготовили их для иммунопептидомного анализа. Авторы изобретения изучили спектры набора данных HLA Класса I из этих образцов нормальной ткани, ища все возможные пептидные последовательности, полученные из полипептидных последовательностей антигена CLT 1. Пептиды, полученные из CLT-антигена 1, не были обнаружены в наборе образцов нормальной ткани (таблица 3), что является дополнительным подтверждением того, что CLT обладают специфической для злокачественного заболевания экспрессией.

В итоге: повторная идентификация иммунопептидомного пептида, полученного из этой предсказанной OPC, демонстрирует, что этот CLT (SEQ ID NO: 3) транслируется в полипептид (SEQ ID NO: 1; называемый CLT-антигеном 1) в опухолевой ткани. Таким образом, этот антиген обрабатывается аппаратом иммунного надзора за клетками и составляющими пептидами (например, SEQ ID NO: 2) загружаются в молекулы HLA Класса I, что позволяет клетке подвергаться цитолизу Т-клетками, которые распознают полученные комплексы пептид/HLA Класса I. Таким образом, ожидается, что CLT-антиген 1 и его фрагменты будут полезны в различных терапевтических средствах для лечения меланомы у пациентов, опухоли которых экспрессируют эти антигены.

Таблица 1. Перечень пептидов, идентифицированных иммунопептидомными анализами образцов опухоли SKCM, вместе с названием CLT-антигена и перекрестной ссылкой на SEQ ID NO.

Пептидная последовательность ¹	Пептид, SEQ ID NO:	CLT-антиген, №:	CLT-антиген, SEQ ID NO:	Пациент, № ²	Масса пептида ³	Длина пептида	-10lgP ⁴	Число спектров ⁵	ч./млн ⁶
LPRTPRPDL IL	SEQ ID NO.2	1	SEQ ID NO.1	Mel 8	1289,7819	11	22,53	2	2,3
LPRTPRPDL IL	SEQ ID NO.2	1	SEQ ID NO.1	Mel 16	1289,7819	11	28,23	5	7
LPRTPRPDL IL	SEQ ID NO.2	1	SEQ ID NO.1	Mel 29	1289,7819	11	28,79	1	-1,4

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

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

³ Расчетная масса пептида.

⁴ Значения -10lgP программы PEAKSTM показаны для пептидов с максимальным соответствием для пептида/пациентов, для которых было получено более одного спектрального обнаружения.

⁵ Число спектров, в которых был обнаружен пептид.

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

Таблица 2. Прогнозируемое связывание NetMHCpan4.0 пептида, идентифицированного методом масс-спектрометрии, с типами HLA пациентов.

Пептид	Пациент ¹	Аллель A1 ¹	Ранговая оценка ²	Аллель A2	Ранговая оценка ²	Аллель B1	Ранговая оценка ²	Аллель B2	Ранговая оценка ²
LPRTPRPDLIL	Mel8	A01:01	25,34	A03:01	45,75	B07:02	0,18	B08:01	4,50
LPRTPRPDLIL	Mel16	A01:01	25,34	A24:01	23,32	B07:02	0,18	B08:01	4,50
LPRTPRPDLIL	Mel29	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-

¹ Bassani-Sternberg et al, 2016, Nature Comm., 7: 13404; NA=нет в наличии

² Рейтинг прогнозирования (%) от NetMHCpan 4.0; оценка менее ≤0,5% означает сильное связывание.

Таблица 3. Количество пептидов, полученных из CLT-антигенов с 1 по 8, в наборе образцов нормальной ткани.

Антиген	Кожа	Легкое	Молочные железы
CLT-антиген 1	0/10	0/9	0/18

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

Пример 3 - Анализы для демонстрации Т-клеточной специфичности антигенов CLT у пациентов с меланомой

Окрашивание реактивных Т-клеток пентамерами пептида CLT-антигена

Присутствие и активность циркулирующих CD8 Т-клеток, специфических к CLT-антигенам, у пациентов с меланомой можно измерить с помощью окрашивания HLA Класса I/пептид-пентамером («пентамер») и/или анализов уничтожения *in vitro*. Таким образом, применение этих методологий к CLT антигену, обнаруженным с использованием способов, описанных в Примерах 1 и 2 (Таблицы 1-3, Фиг. 1-2), может быть использовано для демонстрации существования терапевтически релевантных Т-клеточных ответов на CLT-антиген у пациентов со злокачественным новообразованием.

Для этих исследований CD8 Т-клетки, выделенные из крови пациента,

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

Клетки, окрашенные пентамером, также можно отсортировать и очистить с использованием клеточного сортера с активацией флуоресценции (FACS). Затем отсортированные клетки могут быть дополнительно протестированы на их способность уничтожать клетки-мишени в анализах уничтожения *in vitro*. Эти анализы включают популяцию CD8 Т-клеток и популяцию флуоресцентно меченых клеток-мишеней. В этом случае популяция CD8 является или CLT-антиген-специфической, или отсортированной по пентамеру CD8 Т-клеток и специфической для антигена положительного контроля, который, как известно, индуцирует сильный ответ уничтожения, такой как Mart-1. Клетки-мишени для этих исследований могут включать активированные пептидом клетки T2, которые экспрессируют HLA-A*02, активированные пептидом клетки C1R, трансфицированные HLA-A*02,03 или B*07, или линии клеток меланомы, ранее приведенные как экспрессирующие CLT/CLT-антиген, или опухолевые клетки пациента. Пептиды, используемые для активации клеток T2 или C1R, включают пептиды CLT-антигена или пептиды положительного контроля. Клетки-мишени могут быть дважды помечены витальными красителями, такими как красный ядерный краситель nuclight quick red, который поглощается ядром здоровых клеток. Дополнительные доказательства атаки клеток-мишеней специфическими Т-клетками могут быть продемонстрированы зелеными красителями активности каспазы 3/7, которые демонстрируют апоптоз, опосредованный каспазой 3/7. Таким образом, когда клетки-мишени погибают в результате апоптоза, опосредованного CD8 Т-клетками, они теряют свою красную флуоресценцию и приобретают зеленую флуоресценцию из-за активности каспазы 3/7, присущей апоптозу. Таким образом, применение таких анализов киллинга к отсортированным по пентамерам, CLT-антиген-специфическим CD8 Т-клеткам может быть использовано для подсчета цитотоксической активности CLT-антиген-специфичных Т-клеток *in vivo* культурах Т-клеток пациентов с меланомой.

HERVfest анализ специфичности Т-лимфоцитов у пациентов с меланомой

Технология функционального размножения специфических Т-клеток (Fest - англ.: Functional expansion of specific T cells) была использована для определения специфических полученных из опухоли эпитопов, присутствующих в репертуаре «неоантигена, связанного с мутацией» (MANA - англ.: mutation-associated neoantigen) найденном в опухолевых клетках пациентов, которые ответили на способы лечения с применением блокады контрольных точек (Anagnostou et al., Cancer Discovery 2017; Le et al., Science 2017). Применение этой технологии к CLT-антигену, обнаруженному с использованием методов, разъясненных в примерах 1 и 2 (таблица 1 и 2, фигуры 1-2), может подтвердить существование терапевтически релевантных Т-клеточных ответов на CLT-антиген у пациентов с злокачественным заболеванием.

Как и другие анализы (например, ELISPOT) для идентификации эпитоп-специфических Т-клеток у субъекта, подвергшегося иммунному воздействию, технологии «fest» получают свою специфичность путем размножения родственных Т-клеток в культурах *ex vivo*, которые включают антигенпрезентирующие клетки и подходящие антигенные пептиды. Этот способ отличается от других иммунологических анализов тем, что в нем используется секвенирование мРНК следующего поколения Т-клеточного рецептора (TCR), присутствующего в этих амплифицированных культурах (в частности: TCRseq, нацеленное на область TCR-V β CDR3) для обнаружения специфических TCR, которые размножаются в клетках, культивируемых с целевыми пептидами (предварительно выбранными в соответствии с типом HLA пациента, с использованием стандартных алгоритмов связывания HLA). Применение TCRseq к опухолевым тканям у того же пациента, собранных после успешной терапии блокадой контрольных точек, затем может быть использовано для определения того, какие TCR/Т-клетки, обнаруженные в *ex vivo*, стимулированных пептидами культурах, также присутствуют в месте подавления иммунного ответа раком. В случае MANAfest, указанный способ используется для идентификации специфических TCR, которые распознают представленные МНС неоантигенные пептиды, которые развиваются в опухоли каждого пациента, а также обнаруживаются в Т-клетках в опухолях пациентов, что позволяет идентифицировать функционально релевантные пептиды неоантигенов среди тысяч возможных мутантных пептидов, обнаруженных путем полного экзомного секвенирования нормальных и опухолевых тканей каждого пациента (Le et al., Science 2017).

Применение технологии MANAfest (Anagnostou et al., 2017 Cancer Discovery) к антигенам CLT осуществляется следующим образом. Стадия 1: Пептиды, предположительно содержащие эпитопы, которые эффективно связывают выбранные супертипы HLA, идентифицированы в антигенах CLT. Стадия 2: Отбирают МКПК от соответствующих пациентов и сопоставляют их по типу HLA с пептидной библиотекой, выбранной на стадии 1. Стадия 4: МКПК от этих пациентов разделяют на фракции Т-клеток и не-Т-клеток. Не-Т-клетки облучают (для предотвращения пролиферации), добавляют обратно к Т-клеткам пациента, а затем разделяют на 20-50 образцов и культивируют с факторами роста Т-клеток и индивидуальными CLT-специфическими

синтетическими пептидами (выбранными на стадии 1) от 10 до 14 дней. Стадия 4: TCRseq (секвенирование эпитоп-специфичных последовательностей TCR-V β CDR3) выполняется во всех лунках для идентификации родственных Т-клеток/TCR, которые были амплифицированы в присутствии тестируемых пептидов; специфичность этих TCR определяется путем сравнения с TCR, обнаруженными в неамплифицированных/размноженных Т-клетках, с использованием TCRseq. Данные, полученные на этой стадии, могут подтвердить, какие пептиды вызвали иммунный ответ у пациента. Стадия 5: TCRseq выполняется на образцах опухолей, чтобы определить, какие из специфически усиленных TCR находятся в опухоли пациентов, которые отреагировали на терапию блокадой контрольных точек, обеспечивая доказательство того, что Т-клетки, несущие эти TCR, могут способствовать эффективности терапии блокадой контрольных точек.

Пример 4 - Анализы для демонстрации того, что высокоаффинные Т-клетки, специфические к CLT-антигенам, не были удалены из репертуара Т-клеток нормальных субъектов

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

представляют собой показатели частоты продуцирования Т-клетками ИФН γ и количества ИФН γ на клетку. Кроме того, показатель величины ответа на CLT-антиген может быть получен из индекса стимуляции (SI), который представляет собой специфический ответ, измеренный по количеству пятен или среднему размеру пятна, разделенному на фоновый ответ на моноциты без специфического пептида. Показатель силы стимуляции получается путем умножения индекса стимуляции для числа пятна на индекс стимуляции для интенсивности пятна. Таким образом, сравнения ответов на CLT-антигены и контрольные антигены могут быть использованы для демонстрации того, что наивные субъекты содержат устойчивый репертуар реактивных к CLT-антигену Т-клеток, которые могут быть размножены путем вакцинации иммуногенными составами на основе CLT-антигена. В Таблице 4 предложен перечень пептидов, полученных из CLT-антигена, которые индуцировали значительные CD8 Т-клеточные ответы от HLA-совместимых нормальных доноров крови. Типовые результаты показаны на фигуре 3. Горизонтальные линии представляют собой среднее значение данных. M+t указывает на отсутствие пептида, отрицательный контроль (моноциты и Т-клетки). CEF указывает на положительный контроль (смесь 23 пептидов ЦМВ, ВЭБ и гриппа). Статистическая значимость была измерена с помощью одностороннего теста Анова Краскала-Уоллиса с поправкой на повторные измерения с поправкой Данна. На фигуре 3 представлен пример значимых ответов Т-лимфоцитов CD8 от нормального донора крови на HLA-A * 03:01-ограниченный пептид из CLT-антигена 1 (SEQ ID NO: 6; RPDLLQL CLT001 на фигуре 3).

Таблица 4. Пептиды, полученные от CLT-антигена, которые индуцировали значительные CD8 Т-клеточные ответы от HLA-совместимых нормальных доноров крови

Эталонный CLT-антиген	SEQ ID NO	Пептидная последовательность	HLA-тип для пептида (спрогнозировано при помощи NetMHC)
5	SEQ ID №: 5	TPRPDLILL	HLA-A*03:01
5	SEQ ID №: 6	RPDLILLQL	HLA-B*07:02

Пример 5. Анализы для подтверждения экспрессии CLT в клетках меланомы

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

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (количественная ПЦР-РВ) представляет собой широко распространенный метод определения количества конкретного транскрипта, присутствующего в РНК, выделенной из данного биологического образца. Конкретные последовательности праймеров нуклеиновых кислот конструируют против представляющего интерес транскрипта, а область между праймерами впоследствии амплифицируют посредством серии термоциклических реакций и количественно определяют интенсивность флуоресценции с применением интеркалирующих красителей (SYBR Green). Пары праймеров были

сконструированы против CLT и проанализированы против РНК, экстрагированной из линий клеток меланомы. Немеланомные линии клеток использовали в качестве отрицательного контроля. В частности, линии клеток меланомы COLO 829 (ссылка ATCC CRL-1974), MeWo (ссылка ATCC HTB-65), SH-4 (ссылка ATCC CRL-7724) и контрольные линии клеток HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома, ссылка ATCC HB-8065), Jurkat (Т-клеточный лейкоз, ссылка ATCC TIB152) и MCF7 (аденокарцинома, ссылка ATCC HTB-22) были размножены *in vitro*, а РНК была извлечена из 1×10^6 мгновенно замороженных клеток и обратно транскрибирована в кДНК. Анализ методом количественной ПЦР-РВ с детекцией SYBR Green, следуя стандартным методикам, проводили с праймерами, разработанными против двух областей каждого CLT, и эталонными генами. Относительное количество (RQ) рассчитывали как:

$$RQ = 2^{[Ct(\text{ЭТАЛОН}) - Ct(\text{МИШЕНЬ)]}.$$

Результаты этих экспериментов представлены на фиг.4, где показаны результаты анализа кПЦР-РВ с набором праймеров (88+89), нацеленных на CLT, кодирующий CLT-антиген 1 (SEQ ID NO: 3) на РНК, экстрагированной из трех линий клеток меланомы и трех линий не связанных с меланомой клеток. Эти результаты подтвердили специфическую экспрессию CLT в РНК, экстрагированной из линий клеток меланомы, по сравнению с не связанными с меланомой клетками. CLT был обнаружен в 2/3 из протестированных линий клеток меланомы.

Подтверждение экспрессии CLT в клетках меланомы *in situ* с помощью RNAScope

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

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

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

Предполагаемый уровень экспрессии на клетке в данном разделе:

0=отсутствие окрашивания

1=1-2 точки на клетку

2=2-6 точек на клетку

3=6-10 точек на клетку

4=> 10 точек на клетку

Экспрессия каждого из CLT была обнаружена в нескольких ядрах опухолей различных пациентов, независимо подтверждая открытие данных RNAseq, полученных из опухоли, и подтверждая относительную гомогенность экспрессии в опухолевой ткани в определенных образцах, а также подчеркивая наличие у нескольких пациентов (таблица 5).

Таблица 5 - Оценка RNAScore в биоптатах тканей пациентов с меланомой

		CLT-антиген 1 (SEQ ID NO: 3)	
Ткань	Биоптат	% (+) клеток	Балл
Меланома	61	30	2
Меланома	62	20	1
Меланома	63	10	1
Меланома	64	70	2
Меланома	65	10	1
Меланома	66	80	3
Меланома	67	100	4
Меланома	68	30	2
Меланома	69	10	1
Меланома	70	10	1
Меланома	71	50	3
Меланома	72	90	3

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

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

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

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

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

MLPRTPRPDLILLQLLPAGLRQLLQTSGLPDNEQPIEQDLICNVC

SEQ ID NO: 2 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)

LPRTPRPDLIL

SEQ ID NO: 3 (последовательность кДНК CLT, кодирующая CLT-антиген 1)

CTTTCATCTTTAATTTGACCAAAATGGAAACCAGGATCATGAGAATTCCTCGG
GGCTGGTGTTGAAAGGAATTTCCCCTGCTCTTGCCAGAGTCTCGAGGGGTGGCCTCC
TTCCACGGGTGAGTAACCACAAGTCCATGTGACCGAACAACAGCATATTCTTTTGT
TCAAAAGAGAAAAACAACATTGAAGGAAATCAGCTGAAGAAAATTGAGATGAAAG
CCAGTCCACGCCTCAGCATCCTGAGGAAATGTTCTTCCTTGATGCTCTGAGCTCTCTA
AGAAGTTACCACAAAACCAAACCCATCAGAAGTTTGCAGGACGTCCTTGTTTAGAG
CTGGGAAATAAACCACGAAACAGCGCAAAGGAGAGTCCAGGCCTGCCAATGCTTCC
GCGAACTCCTCGCCCCGACCTCATCCTTCTCCAGCTCCTACCTGCAGGCCTCAGACA
ACTTTTGCAGACCTCTGGTCCGGACAATGAACAACCCATAGAACAAGATCTGATTTG
TAATGTTTGCTGATCTCCAAAGTGTAATACTCCCACCATGACCAATTGGAAGCCAC
TGACAAGTCCTCACTAAATGCAGAATTGAGAAGAAACACGAATAGCACATCATTGT
ATGGTATTTCCACTCTACCAATGGATGTGAATAACCTCAAGAACACATAATGTTGAG
ATGTGGAAAAATCATCAGGAAGCCTCTCCCCTTACCCTGCAGTGTCTCTGCAATGC
TGGTAGAGTGGGCTGGCACAGCCCCCGCCTCTGGCCTGGTCCGGGTCCAACCTGCCT
GCCTCCTGGGGCAGCAGCTCCCTGAACGAAGAGCCGCGGAGACCGAAGAACTCAGT
GAATCAGCAGTTCTCCCAGATGAAACGCTGGCCTGAAAGCAGCCTCAAGAGCTTTG
GCCCCGTACCTTGCCTTGCCTTCTCTTCCTTCCTCGTCCTCTGTTTGTTCATCTTTCCT
GAAAAAATTAAGTCAGCTGTTCCCCTTAACCAATTTCCCTGGCATTCTGAAGGGTAG
GCCACATGGCCACCTGCCAGCTACTCCCACCTGCCAAGCCTTCCTGACTATATTTA
CCCTGGTACTCCCATGTCCCGGGGCTGCTTCAGCAGAGCCAAGGACACACCCAGGT
GTTTGTTTTCTAGGTCAGATTTCTCAGCCATGGGTGTATCTGTGCTTGTCCCTCAAA
ATCCTCATAGCTCCTTTCCCCACCCCAACTTCCAGGCCAGACGGGGTTCAGGGGTGT
CTCAGCTAAGGTTCCCCTGAAGCAGACACAAATTAGTACAAAAGGGACTTATTAGG
AGGTGATCCTTAAAAATTTGGGCAGGAGAATGGAAAGGGTGGACACAGACAAAAA
GGATGCCAAGTGAGAATGTGATGATTACTGCTGCAGTTTTCTACAGCTGCCTGTCAA
ACTATCCCAACACAGTGGCATTGACCAGCAGCCATTTTCGCTATGCCCACAGCTTCT
GTGGGTCAGGCGTTTGGACAGGGCAATGGGAACAGCTTGTTTCTGTTCCATAGTGTG
TGAGGGAGGCCTCAACTGGAAAACCTCAAAGACCGGGGTGGCTTGATGACTGGAGGC
TGGAACCATCCGGAAGCTTCTTGAAGCTGGGTGACTTACATGTGGTCTTGCATGTG
AGTTGGGCTTTTCACATCATGGCTGTTGGGTTCCTAAGAGGCAGTGTCTGGGGAACAA
GAGTTCCAAGACACCAAGGCAGAAGCTGCTAGACCTTTTTTGACCTCGCTTCGGATG
TCAGCAATGAAGTTCTGTGGATTCAACTGCATTCTATTGGTTACCAGCAGTCGCTTG
AATCTGATTAGCTCCAAAACCTGAGTGAGCCTCTGGCAAGAGTGCATTGCAGAAGGG
CACATCCAATGAGAGGGCGCTGCTGTAGTAACAGGGACCTCTCCAATGGCCTGTTTGA
GTGCTCTCAGAATATGGCACCTGGGTTCCTCCAGAGCAAGTGATCTGAGAGAGAGC

AAGGAGAAGGCCACTCTGCCTTTCATGACTCATCTCAGAAGTCACACACTATCACAG
GTTCTGTTCTGTTTCATTGGAAGTGAGTCATGAAGTCCGGCCCCACACTCAAGAGAAAG
GAAATTATGCTCCTTCTTTTGAAATGAGTGTAAGAAAGTAAAACCTTTGTCAAATGTG
TATGTGTGTGTGTGTGTGTGTG

SEQ ID NO: 4 (последовательность кДНК, кодирующая CLT-антиген 1)

ATGCTTCCGCGAACTCCTCGCCCCGACCTCATCCTTCTCCAGCTCCTACCTGC
AGGCCTCAGACAACTTTTGCAGACCTCTGGTCCGGACAATGAACAACCCATAGAAC
AAGATCTGATTTGTAATGTTTGCTGA

SEQ ID №: 5 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)

TPRPDLILL

SEQ ID №: 6 (пептидная последовательность, полученная из CLT-антигена 1)

RPDLILLQL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептид, содержащий последовательность, выбранную из: последовательности SEQ ID NO. 1; и варианта последовательностей из (а); и (с) иммуногенного фрагмента последовательностей из (а).
2. Выделенный пептид по п.1, содержащий или состоящий из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6.
3. Выделенный полипептид по пп. 1 или 2, слитый со вторым или дополнительным полипептидом, выбранным из (i) одного или более других полипептидов по пп. 1 или 2, (ii) других полипептидов, которые представляют собой ассоциированные с меланомой антигены, (iii) полипептидных последовательностей, которые способны усиливать иммунный ответ (т.е. иммуностимулирующие последовательности) и (iv) полипептидных последовательностей, например, содержащих универсальные эпитопы CD4 хелперов, которые способны обеспечивать сильную CD4+ помощь в усилении CD8+ Т-клеточных ответов на эпитопы антигена.
4. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-3.
5. Нуклеиновая кислота по п. 4, которая представляет собой ДНК.
6. Нуклеиновая кислота по п. 5, содержащая или состоящая из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4.
7. Нуклеиновая кислота по п. 6, которая является кодон-оптимизированной в отношении экспрессии в человеческой клетке-хозяине.
8. Нуклеиновая кислота по п. 4, которая представляет собой РНК.
9. Нуклеиновая кислота по пп. 4, 5, 7 или 8, которая представляет собой искусственную последовательность нуклеиновой кислоты.
10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 4-9.
11. Вектор по п. 10, который содержит ДНК, кодирующую регуляторные элементы, подходящие для обеспечения транскрипции трансляционно активной молекулы РНК в человеческой клетке-хозяине.
12. Вектор по пп. 10 или 11, который представляет собой вирусный вектор.
13. Вектор по п. 12, который представляет собой аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (ААВ), альфавируса, вируса герпеса, аренавируса, вируса кори, поксвируса, парамиксовируса, лентивируса и рабдовируса.
14. Иммуногенная фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1-13 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.
15. Композиция вакцины, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1-13 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.
16. Композиция по пп. 14 или 15, которая содержит один или более иммуностимуляторов.

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

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

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

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

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

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

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

24. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или профилактики злокачественного новообразования у человека, при котором злокачественное новообразование экспрессирует последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и их иммуногенных фрагментов и вариантов, причем способ включает введение указанному человеку соответствующего полипептида, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1-18.

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

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

27. Способ лечения злокачественного новообразования у человека, причем раковые

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

37. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или для профилактики злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, который

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

38. Популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция по любому из пп. 30-35 для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и их иммуногенные фрагменты.

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

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

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

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

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

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

45. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или для профилактики злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и их иммуногенных фрагментов и вариантов, который включает введение указанному человеку антигенсвязывающего полипептида или композиции по любому из пп. 40-42 и 44.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, и ее иммуногенных фрагментов и вариантов, или профилактики злокачественного новообразования у человека, при котором злокачественное новообразование экспрессирует последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и их иммуногенных фрагментов и вариантов, причем способ включает введение указанному человеку клетки по п. 51 или п. 52.

56. Цитотоксическая клетка по п. 51 или п. 52 для применения в лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют соответствующую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и их иммуногенные фрагменты.

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

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

58. Способ диагностирования того, что человек страдает от злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, включающий стадии: определения того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и ее иммуногенных фрагментов или вариантов; или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную полипептидную последовательность, и диагностирования у указанного человека злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируется в указанных раковых клетках.

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

(а) определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и ее иммуногенных фрагментов или вариантов, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный полипептид (например, выбранный из последовательностей SEQ ID NO: 3 и 4); и если это так

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

60. Применение полипептида, содержащего последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO. 1; или

варианта последовательностей из (а); и

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

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

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

последовательности SEQ ID NO. 1; и

варианта последовательностей из (а); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (а);

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6, и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

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

последовательности SEQ ID NO. 1; и

варианта последовательностей из (а); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (а);

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6, и, например, нуклеиновая кислота содержит

или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

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

последовательности SEQ ID NO. 1; и

варианта последовательностей из (a); и

иммуногенного фрагмента последовательностей из (a);

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6, и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

65. Способ или применение по любому из пп. 59 или 60, в котором полипептид содержит последовательность, выбранную из:

последовательности SEQ ID NO. 1; и

(b) варианта последовательностей из (a); и

(c) иммуногенного фрагмента последовательности из (a);

и, например, полипептид содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6, и, например, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4;

и при этом злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

По доверенности

Формула изобретения, измененная в соответствии со статьей 34(2)(b) Правил РСТ.

1. Выделенный полипептид (А), содержащий последовательность, выбранную из:
 - (a) последовательности SEQ ID NO. 1; и
 - (b) иммуногенного варианта последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 или (В), состоящий из последовательности любой из SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6.
2. Выделенный полипептид по п. 1, который содержит последовательность SEQ ID NO: 1.
3. Слитый белок, содержащий выделенный полипептид по п. 1 или п. 2, слитый со вторым или дополнительным полипептидом, выбранным из (i) одного или более других полипептидов, содержащих последовательность, выбранную из: (a) последовательности SEQ ID NO: 1; и (b) иммуногенного варианта последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1; и (c) иммуногенного фрагмента последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1 (ii) других полипептидов, которые представляют собой ассоциированные с меланомой антигены, (iii) полипептидных последовательностей, которые способны усиливать иммунный ответ, и (iv) полипептидных последовательностей, которые способны обеспечивать сильную CD4⁺ помощь в усилении CD8⁺ Т-клеточных ответов на эпитопы антигена.
4. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или слитый белок по любому из пп. 1–3.
5. Нуклеиновая кислота по п. 4, которая представляет собой ДНК.
6. Нуклеиновая кислота по п. 5, содержащая или состоящая из последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3 и 4.
7. Нуклеиновая кислота по п. 6, которая является кодон-оптимизированной в отношении экспрессии в человеческой клетке-хозяине.
8. Нуклеиновая кислота по п. 4, которая представляет собой РНК.
9. Нуклеиновая кислота по пп. 4, 5, 7 или 8, которая представляет собой искусственную последовательность нуклеиновой кислоты.
10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 4–9.
11. Вектор по п. 10, который содержит ДНК, кодирующую регуляторные элементы, подходящие для обеспечения транскрипции трансляционно активной молекулы РНК в человеческой клетке-хозяине.

12. Вектор по пп. 10 или 11, который представляет собой вирусный вектор.
13. Вектор по п. 12, который представляет собой аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAB), альфавируса, вируса герпеса, аренавируса, вируса кори, поксвируса, парамиксовируса, лентивируса и рабдовируса.
14. Иммуногенная фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, слитый белок, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1–13 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.
15. Композиция вакцины, содержащая полипептид, слитый белок, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 1–13 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.
16. Композиция по пп. 14 или 15, которая содержит один или более иммуностимуляторов.
17. Композиция по п. 16, в которой иммуностимуляторы выбраны из солей алюминия, сапонинов, иммуностимулирующих олигонуклеотидов, эмульсий типа «масло в воде», аминокилглюкозаминид-4-фосфатов, липополисахаридов и их производных, и других лигандов TLR4, лигандов TLR7, лигандов TLR8, лигандов TLR9, ИЛ-12 и интерферонов.
18. Композиция по любому из пп. 14–17, которая представляет собой стерильную композицию, подходящую для парентерального введения.
19. Полипептид, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–18 для применения в медицине.
20. Способ формирования иммунного ответа у человека, который включает введение указанному человеку полипептида, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–18.
21. Способ по п. 20, в котором формируется иммунный ответ против злокачественной опухоли, экспрессирующей последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.
22. Полипептид, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–18 для применения в формировании иммунного ответа у человека.
23. Полипептид, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по п. 22, в которых формируется иммунный ответ против злокачественной опухоли, экспрессирующей последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и

иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

24. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, или предотвращения злокачественного новообразования у человека, при этом злокачественное новообразование будет экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, при этом способ включает введение указанному человеку полипептида, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–18.
25. Полипептид, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–18 для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов, содержащих по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.
26. Полипептид, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–18 для применения в стимуляции *ex vivo* и/или амплификации Т-клеток, полученных от человека, страдающего от злокачественного новообразования, для последующего повторного введения указанных стимулированных и/или амплифицированных Т-клеток указанному человеку для лечения указанного злокачественного новообразования у указанного человека.
27. Способ лечения злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, который включает забор у указанного человека

популяции лейкоцитов, содержащей по меньшей мере Т-клетки, необязательно с антигенпрезентирующими клетками, стимуляцию и/или амплификацию указанных Т-клеток в присутствии полипептида, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–18, и повторное введение человеку некоторых или всех из указанных лейкоцитов, по меньшей мере стимулированных и/или амплифицированных Т-клеток.

28. Способ или полипептид, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция для применения по любому из пп. 21 и 23–27, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи.
29. Способ получения популяции Т-клеток, цитотоксичных для раковых клеток, экспрессирующих последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, который включает (а) получение Т-клеток, необязательно с антигенпрезентирующими клетками, от пациента со злокачественным новообразованием и (б) стимуляцию и амплификацию популяции Т-клеток *ex vivo* с помощью полипептида, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–18.
30. Популяция Т-клеток, полученная при помощи способа по п. 29.
31. Т-клетка, стимулированная полипептидом, слитым белком, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по любому из пп. 1–18.
32. Антигенпрезентирующая клетка, модифицированная при помощи загрузки *ex vivo* полипептидом, слитым белком, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по любому из пп. 1–18, или генетически сконструированная для экспрессии полипептида по любому из пп. 1–3.
33. Антигенпрезентирующая клетка по п. 32, которая представляет собой дендритную клетку.
34. Экзосома, нагруженная полипептидом, полученная из клеток, нагруженных полипептидом, слитым белком, нуклеиновой кислотой, вектором или композицией по любому из пп. 1–18, или генетически сконструированная для экспрессии полипептида по любому из пп. 1–3.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию Т-клеток, Т-клетку, антигенпрезентирующую клетку или экзосому по любому из пп. 30–34 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.
36. Популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка или экзосома по любому из пп. 30–34 для применения в медицине.
37. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, или профилактики злокачественного человека у человека, причем раковые клетки будут экспрессировать последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1, который включает введение указанному человеку популяции Т-клеток, Т-клетки, антигенпрезентирующей клетки, экзосомы или композиции по любому из пп. 30–35.
38. Популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция по любому из пп. 30–35 для применения при лечении или профилактике злокачественного новообразования у человека, причем раковые клетки экспрессируют последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов, содержащих по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.
39. Способ или популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция для применения по любому из пп. 29, 37 и 38, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи.
40. Способ диагностирования у человека злокачественного новообразования, включающий следующие стадии:
определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6, или нуклеиновую кислоту,

кодирующую указанную полипептидную последовательность, и диагностирование у указанного человека злокачественного новообразования, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируются в указанных раковых клетках.

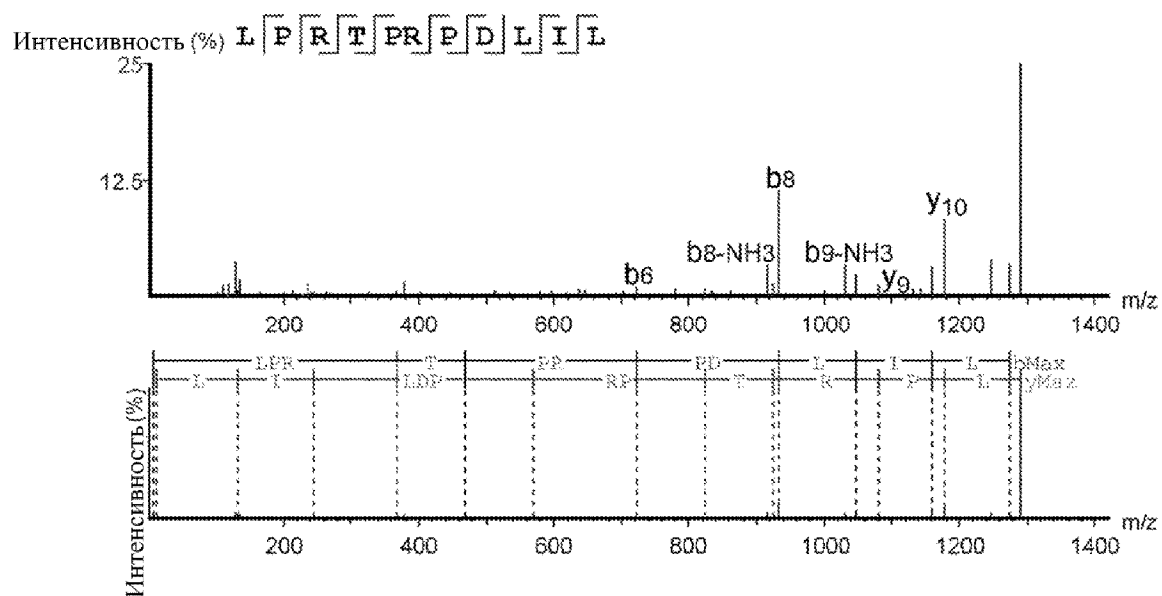
41. Способ диагностирования того, что человек страдает от злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, включающий стадии: определения того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO. 5 или SEQ ID NO. 6; или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную полипептидную последовательность, и диагностирования у указанного человека злокачественного новообразования, которое представляет собой меланому кожи или увеальную меланому, если указанный полипептид или соответствующая нуклеиновая кислота сверхэкспрессируется в указанных раковых клетках.
42. Способ лечения человека, страдающего от злокачественного новообразования, включающий следующие стадии:
 - (a) определение того, экспрессируют ли клетки указанного злокачественного новообразования полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и иммуногенных вариантов последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 и иммуногенных фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1, содержащей по меньшей мере 9 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1 или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид (например, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 3 и 4); и если это так
 - (b) введение указанному человеку полипептида, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора, композиции, популяции Т-клеток, Т-клетки, антигенпрезентирующей клетки или экзосомы по любому из пп. 1–18 и 30–35.
43. Применение полипептида (A), содержащего последовательность, выбранную из:
 - (a) последовательности SEQ ID NO. 1; и
 - (b) иммуногенного варианта последовательности SEQ ID NO: 1, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1 или (B), состоящий из последовательности любой из SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 5 и SEQ ID NO. 6;

выделенной из опухоли человека, страдающего от злокачественного новообразования, или применение нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, в качестве биомаркера для определения того, подходит ли указанный человек для лечения вакциной, содержащей полипептид, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор, композицию, популяцию Т-клеток, Т-клетку, антигенпрезентирующую клетку или экзосому по любому из пп. 1–18 и 30–35.

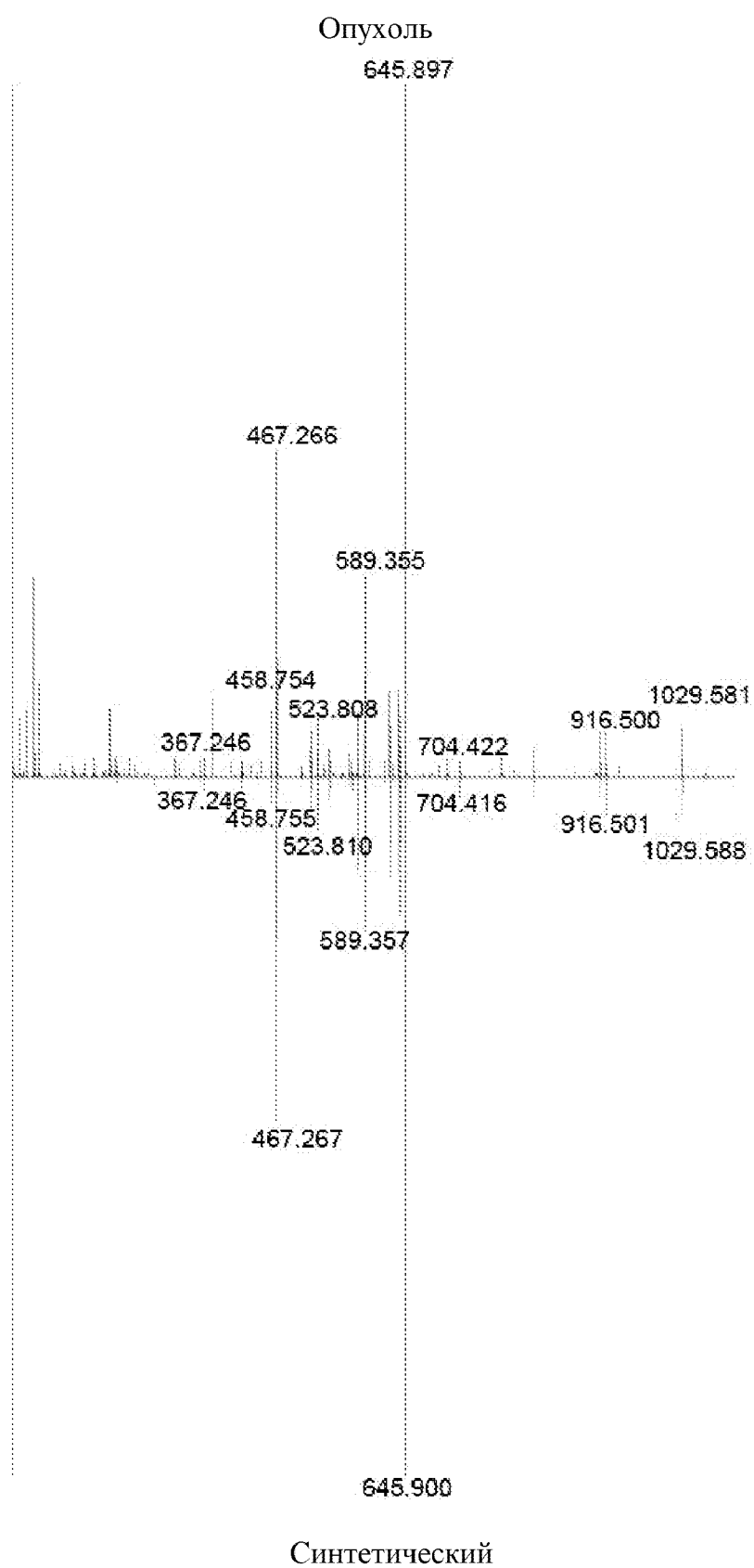
44. Способ или применение по п. 42 или п. 43, в которых злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому кожи
45. Способ или полипептид, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция для применения по любому из пп. 21 и 23–27, в которых злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.
46. Способ или популяция Т-клеток, Т-клетка, антигенпрезентирующая клетка, экзосома или композиция для применения по любому из пп. 29, 37 и 38, в которых злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.
47. Способ или применение по любому из п. 42 или п. 43, в которых злокачественное новообразование представляет собой увеальную меланому.

1/4

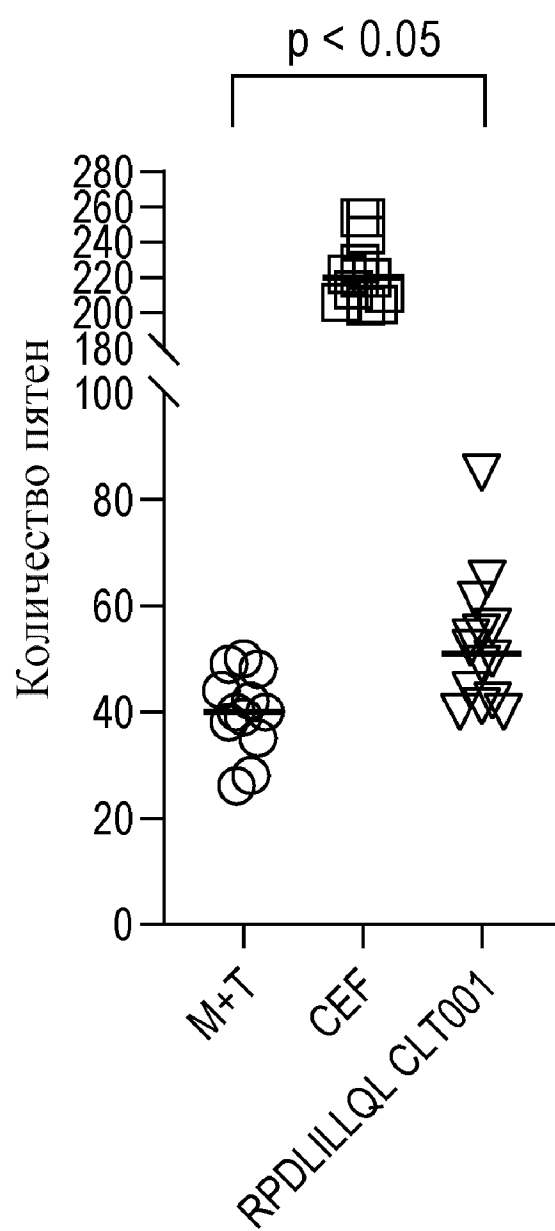
Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4

