

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045010**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.26

(21) Номер заявки
201992860

(22) Дата подачи заявки
2018.07.03

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **НОВЫЕ ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ РАКА ЛЕГКИХ, В ТОМ ЧИСЛЕ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ (НМРЛ), МЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ (МРЛ) И ДРУГИХ ВИДОВ РАКА**

(31) **10 2017 115 301.2; 62/529,758**

(32) **2017.07.07**

(33) **DE; US**

(43) **2020.04.24**

(86) **PCT/EP2018/067979**

(87) **WO 2019/007974 2019.01.10**

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

(72) Изобретатель:
**Фритше Йенс, Шоор Оливер, Сингх
Харпреет, Вайншенк Тони, Сонг
Колетт (DE)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф. (RU)

(56) WO-A1-2015018805
WO-A1-2017060169
WO-A2-2013096862
WO-A1-0131034

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

045010
B1

045010
B1

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

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

Уровень техники

Рак легкого является наиболее частой причиной смертности от рака как среди мужчин, так и среди женщин. Рак легкого представляет собой наиболее распространенный вид рака в мире, как по частоте возникновения, так и по уровню смертности. В 2012 г. было зарегистрировано более 1,8 миллиона новых случаев (13% общего числа заболеваний раком) и 1,6 миллиона смертей (20% общего уровня смертности от рака) вследствие рака легких. Рак легких является основной причиной смертности от рака среди мужчин в 87 странах и среди женщин - в 26 странах. Более чем одна треть всех недавно диагностированных случаев приходится на Китай. Наиболее высокие показатели зафиксированы в Северной Америке, Европе и Восточной Азии (World Cancer Report, 2014).

Начиная с 1987 года, от рака легких ежегодно умирало больше женщин, чем от рака молочной железы. Число смертей среди мужчин значительно снижалось в период с 1991 по 2003 гг., примерно на 1,9% ежегодно. Смертность от рака легких среди женщин сохраняется на неизменном уровне после продолжительного роста на протяжении нескольких десятилетий. Данные тенденции по смертности от рака легких отражают снижение числа курящих на протяжении последних 30 лет.

Согласно данным Национального института рака (National cancer institute, NCI) в 2013 г. в США было зарегистрировано приблизительно 230 000 новых случаев заболевания раком легких и 160 000 смертельных исходов от него.

Исторически сложилось, что мелкоклеточную карциному (МРЛ) легких отличают от немелкоклеточной карциномы легких (НМРЛ), куда входят гистологические типы: аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома и крупноклеточная карцинома. Тем не менее, в течение последнего десятилетия все больше признается различие между аденокарциномой и плоскоклеточной карциномой вследствие существенных различий генетических свойств, а также ответов на специфические виды терапии. Исходя из этого, раковые заболевания легких все чаще классифицируют в соответствии с молекулярным подтипом на основании конкретных генетических изменений, которые вызывают и поддерживают развитие опухоли в легких (Travis et al., 2013).

Прогноз при этом обычно неутешителен. Из всех пациентов после постановки диагноза рака легкого в течение 5 лет выживает 10-15%. Плохие показатели выживаемости пациентов с раком легких являются, хотя бы отчасти, следствием того, что у 80% пациентов на момент постановки диагноза есть метастазы, и у более половины пациентов имеются отдаленные метастазы (SEER Stat facts, 2014). На момент обнаружения IV стадия заболевания наблюдается в 30-40% всех случаев НМРЛ и 60% МРЛ.

Одногодичная относительная выживаемость для пациентов, больных раком легких, слегка возросла с 35% в 1975-1979 гг. до 44% в 2010 году, во многом благодаря усовершенствованиям в хирургической технике и комбинированным способам лечения. Однако 5-летний срок выживаемости для всех стадий в целом составляет лишь 17%. Процент выживаемости для всех случаев, обнаруживаемых, когда заболевание все еще локализовано, составляет 54%; однако только 16% всех случаев рака легких диагностируются на этой ранней стадии. (SEER Stat facts, 2014).

Вид лечения определяется типом (мелкоклеточный или немелкоклеточный) и стадией ракового заболевания и включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, а также биологическую направленную (таргетную) терапию, такими препаратами как бевацизумаб (AVASTIN®) и эрлотиниб (TARCEVA®). Для локализованного вида рака в качестве лечения обычно выбирается операция. Последние исследования указывают на то, что выживаемость при немелкоклеточном раке легких ранней стадии улучшается, если за операцией следует химиотерапия. Так как на момент своего обнаружения заболевание обычно уже распространено, часто используются лучевая терапия и химиотерапия, иногда в сочетании с операцией. Химиотерапия в отдельности или в сочетании с лучевой терапией является стандартным лечением, выбираемым для мелкоклеточного рака легких; при данной схеме лечения большой процент пациентов испытывает ремиссию, которая в некоторых случаях после хирургического вмешательства бывает продолжительной (S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

Распространенный рак легких также имел резистентность к традиционной химиотерапии. Тем не

менее, недавние успехи привели к впечатляющему прогрессу в методах лечения, основанных на гистологии и генетике. Уровень пристального внимания находит свое отражение в клинических исследованиях адьювантной химиотерапии, разработанной для разграничения не только мутаций в кодонах 12 и 13 гена KRAS, но и различных аминокислотных замен, как определено конкретными мутациями в кодоне 12 (Shepherd et al., 2013).

В целях расширения числа возможных способов лечения НМРЛ были изучены или продолжают исследоваться различные иммунотерапевтические подходы. В то время как с помощью вакцинации L-BLP25 или MAGEA3 у пациентов с НМРЛ не удалось продемонстрировать преимуществ по выживаемости, при введении вакцин, одна вакцина на основе аллогенной клеточной линии показала многообещающие результаты в рамках клинических исследований. Кроме того, в настоящий момент ведутся клинические исследования вакцин, мишенями которых являются ганглиозиды, рецептор эпидермального фактора роста и несколько других антигенов. Альтернативная стратегия для усиления противоопухолевого Т-клеточного ответа пациента состоит в блокировке ингибирующих Т-клеточных рецепторов или их лигандов специфическими антителами. Терапевтический потенциал нескольких из этих антител, включая ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MPDL3280A и MEDI-4736, при НМРЛ оцениваются сейчас в клинических исследованиях (Reinmuth et al., 2015).

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

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

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

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

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

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

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

д) ТАА, образующиеся в результате аномальных пост-трансляционных модификаций: такие ТАА могут образоваться из белков, которые не являются ни специфическими, ни избыточно экспрессируемыми в опухолях, однако, несмотря на это, становятся опухолеассоциированными в ходе пост-трансляционных процессов, происходящих преимущественно в опухолях. Примеры для этого класса возникают в результате изменения характера гликозилирования, приводящему к появлению новых эпи-

топов в опухолях, как в случае MUC1, или при таких событиях как белковый сплайсинг во время деградации, которые могут быть опухолеспецифическими или могут не быть ими.

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

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

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

Молекулы МНС I класса встречаются на большинстве клеток, имеющих ядро. Они презентуют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, дефектных рибосомных продуктов (DRIP) и более крупных пептидов. Однако пептиды, образованные из эндосомальных компартментов или экзогенных источников, также часто встречаются на молекулах МНС I класса. Этот неклассический способ презентации I классом в литературе называется кросс-презентацией. (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентовать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются. Комплексы пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими подходящий Т-клеточный рецептор (ТКР), тогда как комплексы пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Хорошо известно, что ТКР, пептид и МНС встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

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

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

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

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

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

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена иммунными клетками, то выделение пептидов II класса непосредственно из первичных опухолей ранее считалось невоз-

возможным. Тем не менее, Dengiel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

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

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

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

Для того чтобы белки были распознаны Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифических или опухолеассоциированных антигенов, и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться предварительные условия. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями. В предпочтительном варианте осуществления пептид должен избыточно презентироваться опухолевыми клетками по сравнению с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т.е. несколько копий соответствующего пептида на клетку).

Опухлеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с их функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени белков, напрямую являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, быть косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja et al., 2004). Необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, чтобы гарантировать, что такой пептид ("иммуногенный пептид"), образованный из опухолеассоциированного антигена, ведет к Т-клеточному ответу *in vitro* или *in vivo*.

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

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

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

Краткое изложение сущности изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно, по меньшей мере на 88%

гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489, где указанный вариант связывается с МНС и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение относится далее к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO 489, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно, по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO 489, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8-100, предпочтительно 8-30 и, наиболее предпочтительно, 8-14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO. и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. В табл. 1 пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 83 связываются с HLA-A*24, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 84 по SEQ ID No. 133 связываются с HLA-A*02, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 134 по SEQ ID No. 201 связываются с HLA-A*01, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 202 по SEQ ID No. 219 связываются с HLA-A*03, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 220 по SEQ ID No. 295 связываются с HLA-B*07, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 296 по SEQ ID No. 318 связываются с HLA-B*08, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 319 по SEQ ID No. 374 связываются с HLA-B*44. Пептиды из табл. 2 были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скринингов с высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями. В табл. 2 пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 375 по SEQ ID No. 387 связываются с HLA-A*24, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 388 по SEQ ID No. 393 связываются с HLA-A*02, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 394 по SEQ ID No. 452 связываются с HLA-A*01, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 453 по SEQ ID No. 458 связываются с HLA-A*03, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 459 по SEQ ID No. 475 связываются с HLA-B*07, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 476 по SEQ ID No. 489 связываются с HLA-B*44. Пептиды из табл. 3 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. В табл. 3 пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 490 по SEQ ID No. 508 связываются с HLA-A*24, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 509 по SEQ ID No. 528 связываются с HLA-A*02, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 529 по SEQ ID No. 530 связываются с HLA-B*07, пептид с последовательностью с SEQ ID No. 531 связывается с HLA-B*44.

Таблица 1

Пептиды в соответствии с настоящим изобретением

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
1	QYDPTPLTW	ADAMTS12	A*24
2	VWSNVTPLKF	MMP12	A*24
3	YLEKIFYGL	MMP12	A*24
4	SYEKVINYL	MAGEA9, MAGEA9B	A*24
5	RYMKKDYLI	SLC35D3	A*24
6	KYKDYFPVI	MAGEC2, LOC392555	A*24
7	VQQWSVAVF	PTHLH	A*24/B*15
8	PFLPPAACFF	ASCL1	A*24
9	RILRFPWQL	MMP11	A*24/A*32
10	VWSDVTPLNF	MMP13	A*24
11	YYSKSVGFMQW	FAM111B	A*24
12	STIRGELFFF	MMP11	A*24/B*57
13	HYTYILEVF	SLC7A11	A*24
14	SYSSCYSF	KRT13, KRT17	A*24
15	KYALLLQDL	PLEKHG4B	A*24
16	TYNPDFSSL	SP9	A*24
17	YYADKKTIVL	SCN9A	A*24
18	DYIGSVEKW	HS6ST2	A*24
19	ILKEDPFLF	MACC1	A*24
20	EFTTVLYNF	TP63	A*24
21	SYEVRSTF	TAS2R38	A*24
22	TQPGDWTLF	POSTN	A*24/B*15
23	KFIISDWRF	FAM83A	A*24
24	MYPDLSELLM	NUP155	A*24
25	SYNGYVFYL	ROS1	A*24
26	KTPTNYLFF	NMUR2	A*24/B*35
27	NYTLYPITF	GXYLT1	A*24
28	YYSIISHTL	ROS1	A*24
29	VYPLLSRLYW	ROS1	A*24
30	QYLPGWTVLF	SLC22A31	A*24
31	QYQNVLTW	DST	A*24
32	SLPDLTPTF	LAMB3	A*24
33	KSSVIASLLF	TMTC3	A*24/B*57
34	MQPRMFFLF	FGD6	A*24
35	KYLEESVWL	GPR98	A*24
36	KQMEDGHTLF	UHRF1	A*24/B*15
37	QWPWQASLQF	TMPRSS3	A*24
38	KYTNWKAFL	MBTD1	A*24
39	LIFMLANVF	GABRP	A*24/A*32
40	QYEPPSAPSTTF	DROSHA	A*24
41	VIYFMGAIF	OR7E24	A*24/B*15

045010

42	TLPNTIYRF	ROS1	A*24
43	IQMDEPMAF	CDC7	A*24/B*15
44	AYLSAVGTF	ABCC1	A*24
45	KYFVPPQLF	B3GNT6	A*24
46	AFPVTSIFHTF	KCNG1, KCNG2	A*24
47	KYADYFLEV	CCNJ	A*24
48	VFIDHPVHLKF	TENM4	A*24
49	LYISEVRNI	DST	A*24
50	SYPELVKMWV	C5orf34	A*24
51	KYALLLQEL	PLEKHG4	A*24
52	KYMKIFHKF	ZNF681	A*24
53	KYITNLEDL	TXNDC16	A*24
54	LLIKLLQTF	PRKDC	A*24/B*15
55	RWMDQRLVF	GABRP	A*24
56	VYMIEPLEL	ADAM23	A*24
57	YPSIIQEF	POLA1	A*24
58	QFAAPLRGIYF	C1QTNF6	A*24
59	KYSTTFFMV	XPR1	A*24
60	TYLSIFDQL	SF3A3	A*24
61	NYAENLTL	FIGNL1	A*24
62	LYQEILAQL	URB1	A*24
63	VMPSDSFFF	GAL3ST4	A*24
64	NYAIFDEGHML	SMARCAD1	A*24
65	VYPASKMFPI	CKAP5	A*24
66	IYFRDSSFL	TEP1	A*24
67	RYPGKFYRV	ZAK	A*24
68	IYQQIIQTY	NCAPG2	A*24
69	IMPEKFEFW	CHD2	A*24
70	PYTNYTFDF	CNOT6, CNOT6L, CNOT6LP1	A*24
71	SYMVLAPVF	SPIN1, SPNS1	A*24
72	RYEGILYTI	LSM14A, LSM14B	A*24
73	SYIGLPLTL	NPC1	A*24
74	VYDQYFITL	ATP8B2	A*24
75	NYIYSISVF	PLAA	A*24
76	WYGWHFPEL	NOP58	A*24
77	AYTLGHEFV	CDC27	A*24
78	TWFPKTPMLF	KBTBD2	A*24
79	RYLADLPTL	CEP85	A*24
80	YYSPLRDLL	Rasa3	A*24
81	LYPEGLRLL	ATP6V0D2	A*24
82	RFLPSPVVI	CUL3	A*24

045010

83	TYCQNIKEF	EIF3H	A*24
84	YVDINTFRL	MMP12	A*02
85	YIDFQSLV	RTL1	A*02
86	FVIDGFDEL	NLRP2	A*02
87	TLYPYQISQL	KIF26B	A*02
88	VQMVITEAQKV	LAMC2	A*02
89	ILSTTMVTV	KIF26B	A*02
90	FLLMHPSI	NDST4	A*02
91	FALPGLLHA	LAMB3	A*02
92	NLRDLLSEV	KIF26B	A*02
93	TLQEKILQV	MYO3A	A*02
94	VLPDIETLIGV	TET1	A*02
95	ITIGVLARV	CEACAM6	A*02
96	HLVGGLHTV	DACH1, DACH2	A*02
97	VLALVNSTV	CBFA2T2	A*02
98	LQSSGLTLLL	MSLNL	A*02/B*13
99	FLKEKVPGI	CDKAL1	A*02
100	RQYPTPFQL	ZNF280C	A*02/B*48
101	FIISDWRFLV	FAM83A	A*02
102	SLLEQAIAL	ST18	A*02
103	FLYYDPDVL	PLXNA1	A*02
104	GMLDIFWGV	RASSF6	A*02
105	SLLTHIPTA	PLEKHG4	A*02
106	FIIDTTYPAYV	FAP	A*02
107	LLQGAIESV	PLEKHG4	A*02
108	MIALSLYI	GPR33	A*02
109	LLLSIGLLGV	OPN3	A*02
110	LLADFQALL	CCDC87	A*02
111	ALCLLLHLL	MARGPRE	A*02
112	SVSDGIHSV	CELSR1	A*02
113	AVLTGLVEV	LRBA	A*02
114	ILDERQVLL	ITGAE	A*02
115	MLETQDALYV	ADORA2B	A*02
116	VLMEENSKL	HAP1	A*02
117	FLDPNARPLV	CAD	A*02
118	ALSSVLHSI	FGD6	A*02
119	RTADITVTV	ITGAE	A*02
120	ALLANLPAV	SLC26A9	A*02
121	ALVDTLTGI	IPO9	A*02
122	ALLEMFPEITV	TXNDC16	A*02
123	LMAFFLAVV	OR6C75	A*02
124	SVASVLLYL	PRKDC	A*02

045010

125	VLQPFPLPSI	IPO9	A*02
126	FLSTVTSV	SOGA2	A*02
127	GLDGSLVFL	MARCH6	A*02
128	FLGTTPTL	SF3B3	A*02
129	VLVDKDAVYV	BMS1	A*02
130	NLWGGQGLLGV	GORASP2	A*02
131	LLKEFVQRV	COL6A3	A*02
132	ALWLVDPDTV	SLC33A1	A*02
133	MTLPVDAVISV	UFSP2	A*02
134	AAEIGDKSWLY	PLA2G7	A*01
135	ASEDSVLLY	CHAF1B	A*01
136	ATDLVVLDY	DICER1	A*01
137	ATSKFMEFY	EDNRA	A*01
138	DSDSCHFN	DCBLD2	A*01
139	ECDMAFHIY	UHRF1, LOC728688	A*01
140	ESDREELNY	CBFA2T2	A*01
141	ESDVGWVY	DDX60L	A*01
142	EVAEPSVLFDLY	C9orf114	A*01
143	FIDYPKKEDY	PLAU	A*01
144	FLDSQNL SAY	BBS1, DPP3	A*01
145	FVDKPVAY	TAF1B	A*01
146	GLNTGSALSY	COL6A3	A*01/B*15
147	GSSDSSTLPKL	TDRD5	A*01
148	GTEFTTILY	TP73	A*01
149	GTEFTTVLY	TP63	A*01
150	GTELLSLVY	PRKDC	A*01
151	HSDLKVG EY	DICER1	A*01
152	HTDSLHL LI	ANKRD52, FLJ25613	A*01
153	KLDRSVFTAY	FAM111B	A*01
154	LLDISQKNLY	ZNF439	A*01
155	LLDPNPHMY	RGS17	A*01
156	LLDSLREQY	SESTD1	A*01
157	LMDRPIFY	GALNS	A*01
158	LSDLLKQGY	PKD2L1	A*01
159	LSDTSVIQFY	C16orf62	A*01
160	LTEAVLNRY	KIF26B	A*01
161	LVDDGTHGQY	TRPM2	A*01
162	LVDNSIRELQY	CARD8	A*01
163	NSDSSLTLREFY	FSTL4	A*01
164	NTDNNLAVY	CXorf61	A*01
165	NTDPTAPPY	CDH3	A*01
166	NTQITDIGRY	HMCN1	A*01

045010

167	QSDPGTSLVGY	SEZ6	A*01
168	QTDHPQPILDY	ITGAE	A*01
169	RLDTPLYFSY	LEPRE1	A*01
170	RSDDTAVYY	IGHA1, IGHA2, IGHD, IGHG3, IGHV1-18, IGHV1-2, IGHV4-31	A*01
171	RSDPVTLNLY	CEACAM6, PSG1, PSG2, PSG4, PSG5, PSG7, PSG8	A*01
172	RTDSCSSAQAQY	DCBLD2	A*01
173	RTEFNLNQY	COL12A1	A*01
174	SADDIRGIQSLY	MMP12	A*01
175	SDVTPLTF	MMP11	A*01
176	SRTINVSPLY	LAMA1	A*01
177	SSDEVNFLVY	TBL1XR1	A*01
178	SSDSSTLPKL	TDRD5	A*01/C*12
179	STAKSATWTY	TP63, TP73	A*01
180	STDPWIQMAY	KDM1B	A*01
181	TADGKTYYY	TCERG1	A*01
182	TDYHVRVY	FNDC3B	A*01
183	TLEDIATSHLY	CBFA2T2	A*01
184	TSAHPEDSSFY	LOC731467, TRBV20-1	A*01
185	TSDSNLNKY	KCNH7	A*01
186	TTDIIKEY	DDX60L	A*01
187	VADLHLYLY	GARS	A*01
188	VSDAKLDKY	RCOR2, LOC441644	A*01
189	VSDSECLSR	LAMA1	A*01
190	VTGGINPLIDRY	FREM2	A*01
191	VTDGSLYEGVAY	DSE	A*01
192	VTEESFDSKFY	CDKAL1	A*01
193	VTEFSLNTY	COL6A3	A*01
194	VVADTKMIEY	ADAMTS12	A*01
195	VVDSVGGYLY	ROS1	A*01
196	WMFFVINY	TMEM217	A*01
197	YADTVRPEFY	COL6A3	A*01
198	YLDPVQRDLY	ZNF655	A*01
199	YLPQHTIETY	TP63	A*01/B*15
200	YSDDEVTKY	SDK2	A*01
201	YVGKEHMFY	MAGEA9, MAGEA9B	A*01
202	KLAELEGALQK	KRT81, KRT121P, KRT83, KRT85, KRT86	A*03
203	KVKDTPGLGK	KIF26B	A*03
204	AVFDKFIY	BTBD17	A*03

045010

205	SLDGAARPK	SP6	A*03
206	KLIDLSQVMY	MACC1	A*03/B*15
207	RSFNGLLTMY	LAMB3	A*03/B*15
208	GLASRILDAK	LAMB3	A*03
209	RTQIPMSEK	RASSF6	A*03
210	ATSGVPVYK	SLC44A5	A*03
211	TVNPVAIHK	GLI2	A*03
212	KAYEQVMHY	FOXA2	A*03
213	LNINMTSPMGTK	PCSK2	A*03
214	RTMSEALVRK	RASSF6	A*03
215	MMFSGPQILKL	ABCC1	A*03/A*32
216	KLYAWELAF	ABCC1	A*03/A*32
217	RILNQILYY	FGD6	A*03
218	KTLVAELLILK	POLQ	A*03
219	RLRSSLVFK	FAM83B	A*03
220	SPSVSQLSVL	PRAME	B*07
221	VPDVAQFVL	MMP1	B*07
222	NPFYPEVEL	MMP1	B*07
223	YPKDIYSSF	MMP1	B*07
224	GPQPWHAAL	MMP11	B*07
225	LPGDGGGIL	MMP11	B*07
226	SPRMSGLLSQT	DLL3	B*07
227	YPRGNHWAVGH	GRP	B*07
228	YPRGNHWAVGHL	GRP	B*07
229	VPLPAGGGTV	GRP	B*07
230	VPLPAGGGTVL	GRP	B*07
231	RPRALRDLQL	NLRP7	B*07
232	RPRALRDLQLL	NLRP7	B*07
233	KPYQGNPTF	DNAH17	B*07
234	RAKNAGVTI	LAMC2	B*07
235	MPLKHLLLL	LRRC15	B*07
236	RVRGGEDGDRAL	INSM1	B*07
237	RPAATAVISL	SLC7A11	B*07
238	KPGPPWAAF	DCBLD2	B*07
239	YVPSASLFML	E2F7	B*07
240	SPREVTTVL	DCBLD2	B*07
241	SARLATDAL	FAM83A	B*07
242	SPRWLPVSL	BTBD17	B*07
243	RPIENRILIL	PSG1, PSG3, PSG4, PSG5, PSG6, PSG7, PSG8, PSG9	B*07
244	FPYVRDFVM	COL6A3	B*07/B*35

045010

245	RIREHVPQL	COL6A3	B*07
246	TPLPAVIVL	SLC7A11	B*07
247	RALLARLLL	PLAU	B*07
248	IPNWARQDL	NLRP7	B*07
249	VPSSRILQL	THEG	B*07
250	SPRDFLSGL	ABCA2, TPH1	B*07
251	VPRSSGQTV	SP6	B*07
252	SPDIRNTTV	DCBLD2	B*07
253	RVIDAVRFTL	TP63	B*07
254	NPFPHLITL	ROS1	B*07
255	MPLLENLYL	MXRA5	B*07
256	SPRVPSIEL	COL7A1	B*07
257	LPRIPFADV	ROS1	B*07
258	LPRGPLASL	CDH3	B*07
259	RPPAAGLRGISL	SEZ6L	B*07
260	YPQHPLNA	SOX2	B*07
261	APSARVVC	KRT86	B*07
262	SAYPQRLEI	CYP24A1	B*07/B*51
263	HPAPYGDLL	GLI2	B*07
264	RPILIIITL	TP73	B*07
265	SPRQPPRLV	CYP24A1	B*07
266	HAYPPGPGL	MMP10	B*07/C*03
267	HPELVNHIVF	GALNT5	B*07/B*35
268	YPLFRGINL	COL5A1	B*07
269	APRAPRLML	ITGA3	B*07
270	APGPRFLVT	CD109	B*07
271	MPLPWSLALP	EGFL6	B*07/B*35
272	MPLPWSLALPL	EGFL6	B*07
273	MPLLWLRGF	INHBA	B*07/B*35
274	TPYQEHVAL	ZNF618	B*07/B*35
275	APHPPLSVV	IQGAP3	B*07
276	LPRAGGAFL	LAMB3	B*07
277	MPLFEPRVF	PTK7	B*07/B*35
278	HPMIDINGIIVF	COL5A1	B*07/B*35
279	SPARASPAL	TMPRSS13	B*07
280	VPISEEGTPVL	KIAA0754	B*07
281	RPRAPVTPA	HES6	B*07
282	MPQIETRVIL	ECT2	B*07
283	RPHLSSEL	ITGAE	B*07
284	FPVTSIFHTF	KCNG1, KCNG2	B*07/B*35
285	FPSFLTNSL	CEP192	B*07/B*35
286	VPCLRSEL	DST, MACF1	B*07

045010

287	APREEQQRSL	KIAA1211	B*07
288	FPQKFIDLL	SASS6	B*07
289	VPENHSVAL	FAM83B	B*07
290	APYRPPDISL	TANC2	B*07
291	SPQRLRGLL	CTHRC1	B*07
292	SPQRLRGLLL	CTHRC1	B*07
293	RPRRALPRLLLP	FZD2	B*07
294	GPTPNTGAAL	COL6A3	B*07
295	KPEGTRIAV	COL6A3	B*07
296	MPMQDIKM	PRAME	B*08
297	RAQLKLVAL	KLHDC7B	B*08
298	FNKRKPLSL	NLRP2	B*08
299	MAQFKEISL	NLRP2	B*08
300	VASPKHCVL	KIF26B	B*08
301	YMHKLLVL	PTH2	B*08/B*35
302	HLLQKQTSI	TP63	B*08
303	LPPFKFTV	GALNT5	B*08
304	ELKKLYCQI	TP63	B*08
305	ALKLRVAVL	C16orf59	B*08
306	ILKVKVGL	POSTN	B*08
307	ILLPRTVSL	MXRA5	B*08
308	MLKQKVEEL	DST	B*08
309	DAIQRKYSC	DST	B*08
310	LPPKKFVL	NUP155	B*08
311	EIRIRVQM	PRKDC	B*08
312	EAMLRNKEL	CENPF	B*08
313	ELKKKEYEEL	CENPF	B*08
314	AISRLVAL	TANC2	B*08
315	DIYQRALNL	VPS13B	B*08
316	VIKEKALTL	USP9X, USP9Y	B*08
317	LVKVKVLL	ARID4A	B*08
318	EAAIRSVEL	DSCR3	B*08
319	AEMLERVIKNY	MAGEA4	B*44
320	MEVDPIGHVYIF	MAGEA3, MAGEA6	B*44
321	AEMLESVIKNY	MAGEA1, MAGEA8, MAGEA9, MAGEA9B	B*44
322	KEVDPAGHSY	MAGEA8, MAGEA9, MAGEA9B	B*44
323	SEFMQVIF	MAGEA9, MAGEA9B	B*44
324	TDSIHAWTF	SLC35D3	B*44/B*18
325	QEVDVLDVQKY	MMP1	B*44
326	QEMQHFLGL	MMP12	B*44

045010

327	YEIARNQVF	MMP12	B*44/B*18
328	FEYDFLLQRI	MMP12	B*44
329	NEHPSNNW	LAMC2	B*44
330	KEGDLGGKQW	ADAMTS12	B*44
331	EDAQGHIW	MMP11	B*44
332	MEVPVIKI	ECT2	B*44
333	AETLSTIQI	KIF26B	B*44
334	AEDEPAA AHL	KIF26B	B*44
335	KELEATKQY	KIF26B	B*44
336	ASSSGPMRWW	LAMB3	B*44/B*57
337	TENRYCVQL	JUP, KRT13, KRT17	B*44
338	SEGSEPALLHSW	FAM83A	B*44
339	SEPALLHSW	FAM83A	B*44
340	TEFSLNTY	COL6A3	B*44
341	EEIEGKGSFTYF	POSTN	B*44
342	HEFSSPSHL	TP63	B*44
343	TEFTTVLY	TP63	B*44
344	EEATGQFHVY	CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6	B*44
345	IEFIHPQAF	MXRA5	B*44
346	VEAPGPVHVYW	PTK7	B*44
347	ALNPYQYQY	DLX5	B*44/A*29
348	AEIQGNINH V	IQGAP3	B*44
349	AEQDMRELT Y	DST	B*44
350	GEDVFKEIL	DCBLD2	B*44
351	EEVNYINTF	CCNE2	B*44
352	NEVLTYIKF	ABCC5	B*44
353	GEIIMQNNW	SERTAD4	B*44
354	TEDPTILRI	PLXNA1	B*44
355	SDMVRFLHF	SGK196	B*44
356	EEGRVYLF	ITGA2	B*44
357	RELENCFQIQ	DNAH14	B*44
358	KEADIHFLI	COL6A5	B*44
359	DELFSIALY	NUP155	B*44
360	AEVPTGVII	ITGA2	B*44
361	SENLFFASF	ITGA2	B*44
362	SEKGVIVQY	NUP155	B*44
363	AELDKLTSV	CENPF	B*44
364	AETPIQNV I	MET	B*44
365	SEMNVNMKY	MET	B*44
366	AENLFRAF	PRKDC	B*44
367	GEVHPSEMI	PRKDC	B*44
368	GEFPVRVQV	YEATS2	B*44
369	EEIERFFKL	NUP155	B*44
370	YEDLSQKY	CENPF	B*44
371	GELALKKKI	PRKDC	B*44
372	TEGIIMKDF	MET	B*44
373	MEMQKSPVF	FSTL4, GRM7, LOC440173, LOC644919, LOC728755, SLC44A5	B*44
374	DEVNFLVY	TBL1X, TBL1XR1, TBL1Y	B*44/B*18

Таблица 2

Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением, ассоциация которых с раком не была известна ранее

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
375	VYSDLHAFYY	MANEAL	A*24
376	KYVKDFHKF	ZNF724P	A*24
377	VYVGAVNRI	PLXNA1	A*24
378	KFLGPAEHLTF	PROM2	A*24
379	NYIVPKQIF	POLA1	A*24
380	VFQEKHHVI	MOXD1	A*24
381	TYSKKHFRI	CHEK2	A*24
382	IYHSHHPTL	OPA1	A*24
383	RYKQDVERF	SMC5	A*24
384	KYVKVFDKF	ZNF107	A*24
385	MYINEVERL	PTPN14	A*24
386	VYNDHSIYVW	MAPKBP1	A*24
387	RWLPQKNAAQF	DOCK5, PPP2R2A	A*24
388	FSIPEGALVAV	ABCC1	A*02
389	TLMEQPLTTL	TXNDC16	A*02
390	HIMPTVHTV	ADNP2	A*02
391	SLIDMRGIETV	SMC6	A*02
392	SLFKDQMEL	IPO8	A*02
393	ILLPYLQTL	TIPARP	A*02
394	ASEAEMRLFY	DHX37	A*01
395	ASEASRLAHY	HIST1H2BA, HIST1H2BL, HIST3H2BB	A*01
396	ASEFGNHLY	SF3B3	A*01
397	ASEITSGASLY	CLUAP1	A*01
398	ASEQQALHTVQY	NUP188	A*01
399	ATDIPCLLY	RINT1	A*01
400	ATDISRQNEY	PDE7A	A*01
401	DSDESYMEKSLY	CLSPN	A*01
402	DTDSQRLAY	E2F1	A*01

045010

403	ELDSKVEVLTY	SNX7	A*01
404	ETARKFLYY	GPD2	A*01
405	ETEEGIYWRV	KREMEN2	A*01
406	ETEQTKEWDY	FUT11	A*01
407	FSDNDKLYLY	RFX5	A*01
408	FTEQWTDGY	TLK2	A*01
409	FVDPLVTNY	TRIT1	A*01
410	GSDHQSPSSSY	ZBTB43	A*01
411	GTVEEDLRY	UBE2C	A*01
412	ILDEVIMGY	KIF11	A*01
413	ISDRYYTALY	CEBPZ	A*01
414	KTDESLTKY	CHD8	A*01
415	LLDPRSHTY	DOCK8	A*01
416	LLDTAQKNLY	ZNF614	A*01
417	LLEDKHFQSY	WDR6	A*01
418	LSDPSGPKSY	RPS6KC1	A*01
419	LSELKPMSY	TMTC3	A*01
420	LTEDKETLQY	TUBGCP2	A*01
421	LTELLERAAFY	SLC15A4	A*01
422	MIDVTKSYY	DCTN5	A*01
423	NLDAVHDITVAY	LCLAT1	A*01
424	NLDEEKQLLY	FRMD6	A*01
425	NLDIIQGEY	WDR75	A*01
426	NLDQATRVAY	SMC4	A*01
427	NSDEQKITEMVY	LRBA	A*01
428	NSELSCQLY	TYMS	A*01
429	NTEDSSMSGYLY	FGD6	A*01
430	NTEGLHHLY	SMEK2, SMEK3P	A*01
431	NTSDMMGRMSY	ARID1A	A*01
432	NVDPVQHTY	AGRN	A*01
433	QIDTGENLY	ZNF267	A*01
434	QTDCAPNNGY	NOMO1, NOMO2, NOMO3	A*01
435	QTDDTWRTEY	ZMYM2	A*01
436	QTETGTPYMLY	RRM1	A*01
437	STDGKHWWWEY	CCNT1, CCNT2	A*01
438	STDNFNCKY	FGD6	A*01
439	TLDAGKFQIY	DHX15	A*01
440	TLDENPGVRY	STXBP3	A*01
441	TLDSALNAASY	TCTN3	A*01
442	TSDFSRFTNY	CCNE2	A*01
443	TTDFPSESSFY	CXorf21	A*01
444	TTDTVIRSY	SETD4	A*01

045010

445	VLDQ GKITEY	ABCB10	A*01
446	VTAQVVGTERY	PLD2	A*01
447	VVDEDEHELIY	CHST11	A*01
448	YLDIPNPRY	CIT	A*01
449	YLDRG TGNVSFY	TRIM4	A*01
450	YSDDGQKWTVY	DCBLD2	A*01
451	YSDSLVQKGY	MSH6	A*01
452	YVDAVLGKGHQY	NUP160	A*01
453	AINTSIKNK	TRPM8	A*03
454	KVYTPSISK	CDKAL1	A*03
455	RIADIFVKK	FGD6	A*03
456	SMFTAILKK	LRBA	A*03
457	SINKPTSER	NDC80	A*03
458	GIADFLVKY	RNFT2	A*03
459	RPMQARAQL	KLHDC7B	B*07
460	MPMAGDMNGL	TP63	B*07
461	RPILIVTL	TP63	B*07
462	RPFHTRATV	KIF26B	B*07
463	TPKAGPTL	KIF26B	B*07
464	YPRPGTPAA	CDKAL1	B*07
465	VPRPFSQL	GREB1, GREB1L	B*07
466	APYKSVTSL	FGD6	B*07
467	KPFSSFTSM	RASSF6	B*07
468	SPMYGQAGL	FOXA2	B*07
469	YPENGVVQM	UHRF1	B*07
470	SPNSYFRVL	PCDHB13, PCDHB8	B*07
471	KPRPDVTNEL	CDCA7	B*07
472	NPRATDAQL	LRBA	B*07
473	LPRALLSSL	IL411	B*07
474	LPRLPAL	HEATR2	B*07
475	RPHKPGLYL	MANEA	B*07
476	AEEEIMKKI	IGF2BP3	B*44
477	QENSYQSRL	LAMC2	B*44
478	SEIEQEIGSL	LAMC2	B*44
479	AEIQPQTQV	PTK7	B*44
480	GEVSGLTKDF	CDKAL1	B*44
481	RELQHEHSL	FAT1	B*44
482	TEREWADEW	CBFA2T2	B*44
483	EENDQSTHKW	YEATS2	B*44
484	AEVGFVFFF	MSH2	B*44
485	SEIEDSTKQVF	BRCA2	B*44
486	SEDDPILQI	NUP155	B*44
487	AEDQLHHSF	GXYLT1	B*44
488	TEFPKMY	TXNDC16	B*44
489	SEIGKAVGF	CLSPN	B*44

Таблица 3

Пептиды в соответствии с настоящим изобретением, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
490	SYVKVLHHL	MAGEA12, LOC101060230	A*24
491	KYLEKYYNL	MMP1	A*24
492	NYEDHFPLL	MAGEA10	A*24
493	TYKYVDINTF	MMP12	A*24
494	RYLEKFYGL	MMP12	A*24
495	SYNDALLTF	TRPM8	A*24
496	VFMKDGFFYF	MMP1	A*24
497	NYPKSIHSF	MMP12	A*24
498	EYIRALQQL	ASCL1	A*24
499	VYFVAPAKF	LAMC2	A*24
500	VWSDVTPLTF	MMP11	A*24
501	GYIDNVTLI	LAMC2	A*24
502	SVHKITSTF	LAMC2	A*24
503	VHFEDTGKTLF	MMP13	A*24
504	VYEKNGYIYF	MMP13	A*24
505	AYISGLDVF	DNAH17	A*24
506	RYVFPLPYL	SOX14	A*24
507	VYIAELEKI	SMC1B	A*24
508	IYVTGGHLF	KLHDC7B	A*24
509	ALLEEEEGV	MAGEA4	A*02
510	KVLEHVVRV	MAGEA4, MAGEA8	A*02
511	KIWEELSVLEV	MAGEA3, MAGEA6	A*02
512	VLGEEQEGV	MAGEA9, MAGEA9B	A*02
513	KLVELEHTL	CXorf61	A*02
514	VQLDSIEDLEV	PRAME	A*02
515	KIFEMLEGV	CT45A1, CT45A2, CT45A3, CT45A4, CT45A5, CT45A6, LOC101060208, LOC101060210, LOC101060211	A*02
516	YTFSGDVQL	MMP1	A*02
517	TLYNPERTITV	IGF2BP1, IGF2BP3	A*02
518	GLLEDERALQL	MEX3A	A*02
519	KIQEILTQV	IGF2BP3	A*02
520	KIQEMQHFL	MMP12	A*02
521	FVYGEPREL	MAGEC2, LOC392555	A*02
522	TLDEKVAEL	MAGEC2	A*02
523	HLIAEIHTA	PTHLH	A*02
524	KVWSDVTPL	MMP11, MMP13	A*02
525	RLDDLKMTV	LAMC2	A*02
526	VLSPFILTL	KLHDC7B	A*02
527	LLDSVSRL	LAMC2	A*02
528	RLLDSVSRL	LAMC2	A*02
529	HPSAHDVIL	LAMC2	B*07
530	APAAWLRSA	MMP11	B*07
531	AEIEADRSY	LAMC2	B*44

Настоящее изобретение относится также в общем к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении пролиферативных заболеваний, например, острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, рака желчных протоков, рака головного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудка, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, гепатоклеточного рака, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака, рака мочевого пузыря и рака матки.

Особенно предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - в соответствии с настоящим изобретением, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 489. Более предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 374 (см. табл. 1), и их применение в иммунотерапии рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, рака желчных протоков, рака головного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудка, плос-

клеточной карциномы головы и шеи, гепатоклеточного рака, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака, рака мочевого пузыря, рака матки и, предпочтительно, рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ).

Таким образом, настоящее изобретение в другом аспекте относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для - предпочтительно комбинированного - лечения пролиферативных заболеваний, выбранных из группы: рак легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), острый миелоидный лейкоз, рак молочной железы, рак желчных протоков, рак головного мозга, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальная карцинома, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желудка, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, гепатоклеточный рак, меланома, неходжкинская лимфома, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечноклеточный рак, рак мочевого пузыря, рак матки.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанные пептиды (каждый из них) состоят или состоят по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO. 1 по SEQ ID NO. 489, предпочтительно содержащий SEQ ID NO. 1 по SEQ ID NO. 374 или его вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, рака желчных протоков, рака головного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудка, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, гепатоклеточного рака, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака, рака мочевого пузыря, рака матки и, предпочтительно, рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ).

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

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

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

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

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

Все термины, используемые здесь, если не указано иное, имеют значения, данные ниже.

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

Понятие "пептид" в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Пептиды предпочтительно имеют длину в 9 аминокислот, но могут быть короче - 8 аминокислот в длину, и длиннее - 10, 11 или 12 или длиннее и в случае пептидов, связанных с молекулами МНС II класса (удлиненные варианты пептидов по изобретению), они могут иметь длину в 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более аминокислот.

Кроме того, понятие "пептид" включает в себя соли серий аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями пепти-

дов, такими как, например, хлорид или ацетат (трифторацетат). Было замечено, что соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов в их состоянии(ях) *in vivo*, так как пептиды не являются солями *in vivo*.

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

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

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

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

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

Таблица 4
Значения частоты экспрессии F для серотипов HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля (F)
A*02	Афроамериканцы (N=28557)	32,3%
	Белые европейцы (N=1242890)	49,3%
	Японцы (N=24582)	42,7%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	46,1%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	30,4%
A*01	Афроамериканцы (N=28557)	10,2%
	Белые европейцы (N=1242890)	30,2%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,0%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	21,0%
A*03	Афроамериканцы (N=28557)	14,8%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,4%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,4%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,6%
A*24	Афроамериканцы (N=28557)	2,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	8,6%
	Японцы (N=24582)	35,5%

	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	13,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	16,9%
В*07	Афроамериканцы (N=28557)	14,7%
	Белые европейцы (N=1242890)	25,0%
	Японцы (N=24582)	11,4%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	12,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,4%
В*08	Афроамериканцы (N=28557)	6,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	21,6%
	Японцы (N=24582)	1,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	7,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	6,2%
В*44	Афроамериканцы (N=28557)	10,6%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,9%
	Японцы (N=24582)	13,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	18,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	13,1%

Частоты встречаемости гаплотипов Gf получены из исследования, в котором использовались данные HLA-типирования из реестра для более чем 6,5 миллионов доноров-добровольцев из США (Gragert et al., 2013). Частота гаплотипа - это частота обособленного аллеля на отдельной хромосоме. В связи с диплоидным набором хромосом в клетках млекопитающих частота встречаемости этого аллеля в генотипе выше и может быть рассчитана при помощи принципа Харди-Вайнберга ($F = 1 - (1-Gf)^2$).

Пептиды по изобретению, предпочтительно когда они включены в состав вакцины по изобретению согласно описанию в настоящем документе, связываются с аллелем А*02, А*01, А*03, А*24, В*07, В*08 или В*44. Вакцина также может включать универсальные пептиды, связывающиеся с МНС II класса. Поэтому вакцина по изобретению может применяться для лечения рака у пациентов, которые являются А*02-, А*01-, А*03-, А*24-, В*07-, В*08- или В*44-положительными, причем в связи с универсальной по связыванию природе данных пептидов не нужен подбор аллотипов МНС II класса.

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

Таблица 5

Охват HLA-аллелем популяции европеоидной расы
(рассчитано в соответствии с (Gragert et al., 2013))

	охват (не менее чем одним А- аллелем)	в комбинац ии с В*07	в комбинац ии с В*44	в комбинац ии с В*07 и В*44
А*02 / А*01	70%	78%	78%	84%
А*02 / А*03	68%	76%	76%	83%
А*02 / А*24	61%	71%	71%	80%
А*01 / А*03	52%	64%	65%	75%
А*01 / А*24	44%	58%	59%	71%
А*03 / А*24	40%	55%	56%	69%
А*02 / А*01 / А*03	84%	88%	88%	91%
А*02 / А*01 / А*24	79%	84%	84%	89%
А*02 / А*03 / А*24	77%	82%	83%	88%
А*01 / А*03 / А*24	63%	72%	73%	81%
А*02 / А*01 / А*03 / А*24	90%	92%	93%	95%

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ны определенно рассматривается в изобретении. Более того, определенно включен заявленный полипептид, чистота которого составляет, предпочтительно, 99,999% или по меньшей мере 99,99% или 99,9%; и даже желательно 99% по массе или более.

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

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

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

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

где "С" является числом различий между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью по длине выравнивания между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью, где:

- (i) каждое основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего выравненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, и
 - (ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и
 - (iii) каждое выравненное основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые отличаются от выравненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, представляют собой различие; и
 - (iiii) выравнивание должно начинаться с позиции 1 выравненных последовательностей;
- и "R" - это число оснований или аминокислот в Контрольной последовательности по длине выравнивания со Сравниваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в Контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

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

Как было упомянуто выше, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или -удлиненные версии упомянутых пептидов - с МНС II класса.

В настоящем изобретении термин "гомологичный" относится к степени идентичности (см. выше, Процентная доля идентичности) между последовательностями двух аминокислотных последовательностей, т.е. пептидных или полипептидных последовательностей. Упомянутая ранее "гомология" определя-

ется при сравнении двух последовательностей, сопоставляемых в оптимальных условиях для сравниваемых последовательностей. Такая гомология последовательностей может быть подсчитана с помощью создания выравнивания, например, по алгоритму ClustalW. Широко распространено программное обеспечение для анализа последовательностей, в частности, Vector NTI, GENETYX или другие инструменты, предоставляемые банками данных свободного доступа.

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

Под "вариантом" данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 489. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы MHC, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохранят ли такие варианты способность связываться с молекулами MHC I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

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

Консервативные замены определены в контексте настоящего описания как обмены внутри одной из последующих пяти групп: группа 1 - малые, алифатические, неполярные или слабо полярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); группа 2 - полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln); группа 3 - полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys); группа 4 - крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); и группа 5 - крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

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

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

Если были произведены замены в более чем одной позиции с получением пептида с по существу

эквивалентной или большей антигенной активностью, как определено ниже, то комбинации таких замен будут проанализированы для определения того, приведут ли эти комбинации замен к дополнительным или синергическим эффектам по отношению к антигенности пептида. По большей части не более 4 позиций внутри пептида должны замещаться одновременно.

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

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

Таблица 6

Варианты и мотив пептида в соответствии с SEQ ID NO: 4,
13, 90, 93, 138, 171, 202, 204, 224, 294, 306, 316, 322 и 327

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No											
4	S	Y	E	K	V	I	N	Y	L		
Вариант									I		
									F		
		F							I		
		F									
		F							F		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		

045010

SEQ ID No 13	H	Y	T	Y	I	L	E	V	F		
Вариант									I		
									L		
		F							I		
		F							L		
		F									
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8			
SEQ ID No 90	F	L	L	M	H	P	S	I			
Вариант								V			
								L			
								A			
		M						V			
		M									
		M						L			
		M						A			
		A						V			
		A									
		A						L			
		A						A			
		V						V			
		V									
		V						L			
		V						A			
		T						V			
		T									
		T						L			
		T						A			
		Q						V			
		Q									
		Q						L			
		Q						A			
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 93	T	L	Q	E	K	I	L	Q	V		
Вариант									I		
									L		
									A		
		M									
		M							I		
		M							L		
		M							A		
		A									

		A							I		
		A							L		
		A							A		
		V									
		V							I		
		V							L		
		V							A		
		T									
		T							I		
		T							L		
		T							A		
		Q									
		Q							I		
		Q							L		
		Q							A		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 138	D	S	D	S	C	H	F	N	Y		
Вариант									A		
			E								
			E						A		
		T									
		T							A		
		T	E								
		T	E						A		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID No 171	R	S	D	P	V	T	L	N	V	L	Y
Вариант											A
			E								
			E								A
		T									
		T									A
		T	E								
		T	E								A
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID No 202	K	L	A	E	L	E	G	A	L	Q	K
Вариант											Y
											R
											F
		I									
		I									Y
		I									R

045010

		I									F
		M									
		M									Y
		M									R
		M									F
		V									
		V									Y
		V									R
		V									F
		T									
		T									Y
		T									R
		T									F
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 204	A	V	F	D	K	F	I	R	Y		
Вариант		L							K		
		L									
		L							R		
		L							F		
		I							K		
		I									
		I							R		
		I							F		
		M							K		
		M									
		M							R		
		M							F		
									K		
									R		
									F		
		T							K		
		T									
		T							R		
		T							F		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 224	G	P	Q	P	W	H	A	A	L		
Вариант									F		
									V		
									M		
									A		
									I		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

045010

SEQ ID No 294	G	P	T	P	N	T	G	A	A	L	
Вариант										F	
										V	
										M	
										A	
										I	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8			
SEQ ID No 306	I	L	K	V	K	V	G	L			
Вариант								V			
								I			
								M			
								F			
					R						
					R			V			
					R			I			
					R			M			
					R			F			
					H						
					H			V			
					H			I			
					H			M			
					H			F			
			R								
			R					V			
			R					I			
			R					M			
			R					F			
			R		R						
			R		R			V			
			R		R			I			
			R		R			M			
			R		R			F			
			R		H						
			R		H			V			
			R		H			I			
			R		H			M			
			R		H			F			
			L								
			L					V			
			L					I			
			L					M			
			L					F			

			L		R					
			L		R			V		
			L		R			I		
			L		R			M		
			L		R			F		
			L		H					
			L		H			V		
			L		H			I		
			L		H			M		
			L		H			F		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SEQ ID No 316	V	I	K	E	K	A	L	T	L	
Вариант									V	
									I	
									M	
									F	
					R					
					R				V	
					R				I	
					R				M	
					R				F	
					H					
					H				V	
					H				I	
					H				M	
					H				F	
			R							
			R						V	
			R						I	
			R						M	
			R						F	
			R		R					
			R		R				V	
			R		R				I	
			R		R				M	
			R		R				F	
			R		H					
			R		H				V	
			R		H				I	
			R		H				M	
			R		H				F	
			L							
			L						V	

			L						I		
			L						M		
			L						F		
			L		R						
			L		R				V		
			L		R				I		
			L		R				M		
			L		R				F		
			L		H						
			L		H				V		
			L		H				I		
			L		H				M		
			L		H				F		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
SEQ ID No 322	K	E	V	D	P	A	G	H	S	Y	
Вариант										F	
										W	
										L	
		D								F	
		D								W	
		D									
		D								L	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
SEQ ID No 327	Y	E	I	E	A	R	N	Q	V	F	
Вариант										W	
										Y	
										L	
		D									
		D								W	
		D								Y	
		D								L	

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

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

Таблица 7

Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

В альтернативном варианте осуществления пептид удлинен с одной или другой стороны или с двух сторон одновременно добавлением более 4 аминокислот, предпочтительно, до общей длины вплоть до 30 аминокислот. Это может привести к образованию пептидов, связывающихся с МНС II класса. Связывание с МНС II класса может быть проверено известными из уровня техники способами.

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

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

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489.

"Состоит по существу из" подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489, или его вариант, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или C-конце фрагменты последовательности аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для молекул МНС.

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

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

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

Непептидной связью является, например, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей (-CH₂-NH) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции аминокислоты и аминокислоты в присутствии NaCNBH₃.

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

того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа может быть добавлена к карбоксильным концам пептидов.

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

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

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

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств. К-реагент Вудворда может использоваться для модификации определенных остатков глутаминовой кислоты.

N-(3-(Диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты. Например, диэтилпироксид является реагентом для модификации гистидильных остатков в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-ноненаля. Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения полиэтиленгликоля и основным сайтом модификации при гликозилировании белков. Остатки метионина в белках могут быть модифицированы, например, с помощью йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

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

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

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

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

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к не встречающемуся в природе пептиду, где указанный пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID No: 1 по SEQ ID NO: 489 и был получен синтетическим способом (например, синтезирован) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов хорошо известны в данной области. Соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов по своему состоянию(ям) *in vivo*, так как синтезированные пептиды не являются

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

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

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

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

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

В целях выбора презентруемых в изыскании пептидов был рассчитан профиль презентации, позволяющий оценить медианное значение презентации образца, а также вариации повторных измерений. В профиле сравниваются образцы опухолевой формы, представляющей интерес, с фоновым уровнем об-

разцов нормальной ткани. Каждый из этих профилей может быть затем консолидирован в показатель избыточной презентации путем расчета значения p по линейной модели со смешанными эффектами (Pinheiro et al., 2015), скорректировав ее для повторных анализов на уровень ложноположительных обнаружений (Benjamini and Hochberg, 1995) (ср. пример 1, фиг. 1).

Для идентификации и относительной количественной оценки лигандов HLA с помощью масс-спектрометрического анализа молекулы HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были очищены и из них выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены и последовательности были идентифицированы с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS) с ионизацией электрораспылением (nanoESI) в режиме реального времени. Полученные пептидные последовательности подтверждали сравнением картины фрагментации природных опухолеассоциированных пептидов TUMAP, записанной на образцах ($N = 201$ образец) рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), с картинами фрагментации соответствующих синтетических контрольных пептидов с идентичными последовательностями. Поскольку пептиды были идентифицированы непосредственно в качестве лигандов молекул HLA первичных опухолей, то эти результаты дают прямое доказательство естественного процессирования и презентации идентифицированных пептидов на ткани первичной раковой опухоли, полученной от 201 пациент с раком легких (в том числе НМРЛ и МРЛ).

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

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

Комплексы HLA-пептид из образцов опухолевой ткани рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ) были очищены; HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС (см. пример 1). Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), что подтверждает их презентацию на клетках рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ).

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

Кроме избыточной презентации пептида была исследована экспрессия мРНК исходного гена. Данные по мРНК, полученные с помощью секвенирования РНК (RNASeq) из нормальной ткани и раковых тканей (ср. пример 2, фиг. 2). Дополнительным источником данных о нормальной ткани служил общедоступный банк данных по экспрессии РНК из приблизительно 3000 образцов нормальной ткани (Lonsdale, 2013). Пептиды, которые получены из белков, которые кодируются мРНК, демонстрирующей высокую степень экспрессии в раковой ткани, но ее очень низкий уровень или отсутствие в жизненно важных нормальной ткани, были включены как предпочтительные в настоящее изобретение.

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний/опухолей, предпочтительно рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), клетки которых презентуют в избытке или исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичного рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ) человека.

Многие из исходных генов/белков (называемых также "белками полной длины" или "базовыми белками"), из которых были получены пептиды, были в высокой степени избыточно экспрессированы в клетках рака по сравнению с нормальными тканями - понятие "нормальные ткани" в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки легких или другие нормальные клетки ткани, демонстрирующие высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. пример 2). Более того, сами пептиды в высшей степени избыточно презентуются на опухолевой ткани - понятие "опухолевая ткань" в

связи с настоящим изобретением подразумевает образец ткани пациента, страдающего от рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), но не на нормальных тканях (см. пример 1).

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами. Т-клетки могут разрушать клетки, презентующие распознанный комплекс HLA/пептид; к примеру, клетки рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), презентующие полученные пептиды.

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентуются и, поэтому, могут использоваться для получения антител и/или ТКР, такие как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. пример 3, пример 4). Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках (см. также ниже). Таким образом, пептиды по настоящему изобретению пригодны для генерирования иммунного ответа в организме пациента для уничтожения опухолевых клеток. Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т.е. адьювантом). Можно ожидать, что иммунный ответ, вызванный такой терапевтической вакцинацией, будет высоко специфично направлен против опухолевых клеток, так как целевые пептиды по настоящему изобретению не презентуются на нормальных тканях в сравнимом количестве копий, предотвращая, тем самым, риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

Настоящее описание далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), включающим альфа-цепь и бета-цепь ("альфа/бета-ТКР"). Также предложены пептиды в соответствии с изобретением, способные связываться с ТКР и антителами, если они презентуются молекулой МНС.

Настоящее описание также относится к фрагментам ТКР в соответствии с изобретением, которые способны связываться с пептидным антигеном в соответствии с настоящим изобретением, когда они презентуются молекулой HLA. Данный термин в частности относится к растворимым фрагментам ТКР, например, ТКР без трансмембранных сегментов и/или константным участкам, одноцепочечным ТКР и продуктам их слияния, например, с Ig.

Настоящее описание также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам для экспрессии ТКР и пептидам по настоящему изобретению; и методам их применения.

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

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

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

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

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

ТКР по настоящему изобретению предпочтительно связываются с комплексом пептида и молекулы HLA с аффинностью связывания (KD) около 100 мкМ или ниже, около 50 мкМ или ниже, около 25 мкМ или ниже или около 10 мкМ или ниже. Более предпочтительными являются высокоаффинные ТКР с аф-

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает инкубацию МКПК здоровых доноров, отрицательных по отношению к настоящему аллелю, с мономерными комплексами HLA/пептид, инкубацию МКПК с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высокой avidностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

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

В одном аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию,

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

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

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

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

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

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

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

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

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными эквивалентами (С-концевой "муринизированный" домен); получение второй межцепочечной дисульфидной связи в С-концевом домене за счет введения второго остатка цистеина в обе цепи: ТКР-альфа и ТКР-бета введенного ТКР (модификация цистеином); обмен взаимодействующими остатками в С-концевом домене ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей ("выступ-во-впадину"); и слияние вариабельных доменов цепей ТКР-альфа и ТКР-бета непосредственно в CD3ζ (слияние CD3ζ) (Schmitt et al., 2009).

В одном варианте осуществления клетка-хозяин генетически модифицирована, чтобы экспрессировать ТКР согласно настоящему описанию. В предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин

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

"Фармацевтическая композиция" является композицией, подходящей для введения человеку в медицинском учреждении. Предпочтительно, если фармацевтическая композиция является стерильной и произведена в соответствии с правилами GMP (надлежащей производственной практики).

Фармацевтические композиции включают пептиды как в свободной форме, так и в форме фармацевтически приемлемой соли (см. также выше). В одном аспекте пептид, описываемый в настоящем контексте, представлен в форме фармацевтически приемлемой соли. В другом аспекте пептид представлен в форме фармацевтической соли в кристаллической форме.

В одном аспекте фармацевтически приемлемая соль, описываемая в настоящем контексте, относится к солям, имеющим профили токсичности в диапазоне, который приемлем для фармацевтического применения.

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

В одном аспекте фармацевтически приемлемые соли могут повышать растворимость и/или стабильность пептидов, описываемых в настоящем контексте. В другом аспекте фармацевтические соли, описываемые в настоящем контексте, могут быть получены обычными средствами из соответствующего пептида-носителя или комплекса с помощью реакции, например, подходящей кислоты или основания с пептидами или комплексами, описываемыми в настоящем контексте. В другом аспекте фармацевтически приемлемые соли представлены в кристаллической или полукристаллической форме. В еще в одном аспекте фармацевтически приемлемые соли могут включать, например, те соли, что описаны в работе "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" авторов P. H. Stahl и C. G. Wermuth (Wiley-VCH 2002) и L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, в "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology". Eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, pp. 453-499, каждая из этих ссылок включена в настоящую заявку ссылкой в ее полном объеме.

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

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

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

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No 489, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Известно множество систем экспрессии, включающих бактерии (например, *E. coli* и *Bacillus*

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

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

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

В другом предпочтительном варианте осуществления кодируются два или более пептида или варианта пептидов по изобретению и, таким образом, они экспрессируются последовательно (как в случае структуры типа "бусины на нити").

В этих целях пептиды или варианты пептидов могут быть соединены или слиты воедино с помощью фрагментов линкерных аминокислот, таких как, например, LLLLLL, или же могут быть соединены без какого(их)-либо дополнительного(ых) пептида(ов) между ними. Эти структуры могут быть также использованы в противораковой терапии и, возможно, индуцировать иммунные ответы с участием как молекул МНС I, так и МНС II класса.

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

Трансформация соответствующих клеток-хозяев с помощью ДНК-конструкции по настоящему изобретению производится при помощи хорошо известных способов, которые обычно зависят от типа используемого вектора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, работу Cohen и соавт. (Cohen et al., 1972) и (Green and Sambrook, 2012). Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт. (Sherman et al., 1986). Также подходит метод Бигса (Beggs) (Beggs, 1978). Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты,

например, фосфат кальция и DEAE-декстран или липосомальные составы, имеются в наличии в Strata-gene Cloning Systems или Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Мэриленд 20877, США. Электропорация также подходит для трансформации и/или трансфекции клеток и хорошо известна из уровня техники для трансформации дрожжевых клеток, бактериальных клеток, клеток насекомых и клеток позвоночных.

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

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

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

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

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

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

Медикамент по изобретению может также включать один или более адъювантов. Адъюванты - это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками или хелперными Т-клетками (ТН) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте по настоящему изобретению. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, СуаА, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии "вода в масле" и "масло в воде", ОК-432, ОМ-174, ОМ-197-МР-ЕС, ОНТАК, ОспА, векторную систему PepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстране микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонина, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъю-

ванты, такие как Detox компании Ribi, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотнесены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF- α), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5 849 589, специально включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 B1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двухцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

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

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

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

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод и резиквимод. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювантом является циклофосфамид, имиквимод или резиквимод. Еще более предпочтительными адъювантами являются монтанид IMS 1312, монтанид ISA206, монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и моноклональные антитела к CD40 или их комбинации.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутрикожное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и - необязательно - другие молеку-

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

В одном аспекте пептиды или другие молекулы, описанные в настоящем контексте, могут комбинироваться с водным носителем. В одном аспекте водный носитель выбирают из: ионообменное вещество, оксид алюминия, стеарат алюминия, стеарат магния, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, двузамещенный фосфорнокислый натрий, дикальция фосфат, дикалия гидрофосфат, хлорид натрия, соли цинка, коллоидная двуокись кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, поливинилпирролидон-винилацетат, вещества на основе целлюлозы (например, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, сукцинат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы), крахмал, моногидрат лактозы, маннит, трегалоза, лаурилсульфат натрия и кроскармеллоза натрия, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, полиметакрилат, воски, полиэтилен-полиоксипропилен-блок-сополимеры, полиэтиленгликоль и ланолин.

В одном аспекте водный носитель содержит множество компонентов, таких как вода, вместе с компонентом в виде неводного носителя, таким как те, что описаны в настоящем контексте. В другом аспекте водный носитель способен обеспечивать улучшенные свойства в комбинации с пептидом или другой молекулой, описанными в настоящем контексте, например, улучшенную растворимость, эффективность и/или улучшенные иммунотерапевтические свойства. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. "Фармацевтически приемлемый разбавитель", например, может включать растворители, объемобразующие агенты, стабилизаторы, дисперсионные среды, вещества для покрытия оболочкой, антибактериальные и противогрибковые вещества, изотонические вещества и вещества, задерживающие всасывание и т.п., обладающие физиологической совместимостью. Примеры фармацевтически приемлемых разбавителей включают один или несколько физиологический раствор, физиологических растворов с фосфатным буфером, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительно включить в состав одно или несколько изотонических веществ, например, сахара, такие как трегалоза и сахароза, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбитол или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие вещества или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, консерванты или буферы, также входят в объем настоящего изобретения. Помимо этого, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы и смазывающие вещества.

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

В контексте настоящего описания понятие "каркас" относится к молекуле, которая специфически связывается с (например, антигенной) детерминантой. В одном варианте осуществления каркас способен направлять единицу, к которой он прикреплен (например, (второй) антиген-связывающий элемент) к сайту-мишени, например, к конкретному виду опухолевых клеток или стромы опухоли, несущих антигенную детерминанту (например, комплекс пептида с МНС в соответствии с настоящей патентной заявкой). В другом варианте осуществления каркас способен активировать пути передачи сигналов за счет

его антигена-мишени, например, антигена комплекса Т-клеточного рецептора. Каркасы включают, но без ограничения, антитела и их фрагменты, антигенсвязывающие домены антитела, включающие варибельный участок тяжелой цепи антитела и варибельный участок легкой цепи антитела, связывающие белки, включающие по меньшей мере один мотив анкиринового повтора и однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы, аптамеры, (растворимые) ТКР и (модифицированные) клетки, такие как аллогенные или аутологичные Т-клетки. Чтобы оценить, является ли молекула каркасом, связывающимся с мишенью, может быть проведен анализ связывания.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 489, в соответствии с настоящим изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

Пептиды по настоящему изобретению могут использоваться для получения и разработки специфич-

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 489 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 489, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 489 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 489, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30 и, наиболее предпочтительно, от 8 до 14 аминокислот.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности, в лечении рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ).

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ) или клетками других солидных или гематологических опухолей, таких как клетки острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, рака желчных протоков, рака головного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудка, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, гепатоклеточного рака, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака, рака мочевого пузыря, рака матки.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые "мишенями", которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза течения рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ). Настоящее изобретение относится также к применению этих новых мишеней для лечения рака.

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

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

Например, кДНК, кодирующая пептид в соответствии с настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 489, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, дрожжей, насекомых или клетках млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата из моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), использованным для получения антитела по изобретению.

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

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное из, по существу, гомогенной популяции антител, т.е. отдельные антитела внутри популяции идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть представлены в небольших количествах. Моноклональные антитела в контексте настоящего изобретения специфически включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная(ые) часть(и) цепи идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, полученных из другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, в равной степени как и фрагментов таких антител, пока они проявляют желаемую антагонистическую активность (Патент США № 4 816 567, который включен в настоящее описание в полном объеме).

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

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

In vitro-методы также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в особенности Fab-фрагментов, может быть произведено при использовании стандартных методик, известных из уровня техники. К примеру, расщепление может производиться при использовании папаина. Примеры расщепления под воздействием папаина описываются в заявке WO 94/29348 и в патенте США № 4 342 566. Расщепление антител под воздействием папаина обычно приводит к двум идентичным фрагментам, связывающимся с антигеном и называемым Fab-фрагментами, каждый из которых имеет отдельный антиген-связывающий сайт и остаточный Fc-фрагмент. В результате обработки пепсином получается фрагмент F(ab')₂ и фрагмент pFc'.

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

Антитела по изобретению могут далее включать гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител - это химерные имму-

ноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab' или другие антиген-связывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из комплементарных детерминантных областей (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающая способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в антитело-реципиенте, ни в импортированном CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по сути все из участков FR являются таковыми консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

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

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

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

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

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

В другом аспекте изобретения предложен способ получения растворимого Т-клеточного рецептора (ТКР), распознающего конкретный комплекс пептида и МНС. Такие растворимые Т-клеточные рецепторы могут быть получены из специфических Т-клеточных клонов, и их аффинность может быть повышена за счет мутагенеза, направленного на определяющие комплементарность участки. Для выбора Т-клеточного рецептора может использоваться фаговое отображение (заявка США 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). В целях стабилизации Т-клеточных рецепторов в процессе фагового отображения и в случае практического применения в качестве лекарственного средства альфа- и бета-цепи могут быть связаны, например, посредством не встречающихся в природе дисульфидных связей, других ковалентных связей (одноцепочечный Т-клеточный рецептор) или с помощью доменов димеризации (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). В целях выполнения определенных функций на клетках-мишенях Т-клеточный рецептор может быть связан с токсинами, лекарственными средствами, цитокинами (см., например, заявку США 2013/0115191) и доменами, рекрутирующими эффекторные клетки, такими как анти-CD3 домен, и т.д. Более того, он может быть экспрессирован на Т-клетках, используемых для адоптивного переноса. Дополнительную информацию можно найти в патентных заявках WO 2004/033685A1 и WO 2004/074322 A1. Комбинация растворимых ТКР описывается в патентной заявке WO 2012/056407 A1. Другие способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586 A1.

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

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

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

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

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

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

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

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

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпоч-

тельно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 489 или вариант такой аминокислотной последовательности.

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

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

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая aberrантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO489.

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

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

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

Под понятием "aberrантно экспрессированный" авторы изобретения подразумевают также, что полипептид экспрессирован в избытке по сравнению с уровнями экспрессии в нормальных тканях, или что ген является "молчащим" в ткани, из которой образовалась опухоль, однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием "экспрессирован в избытке" авторы изобретения понимают, что полипептид представлен на уровне, который, по меньшей мере, в 1,2 раза выше уровня, представленного в нормальной ткани; предпочтительно, по меньшей мере, в 2 раза и, более предпочтительно, по меньшей мере, в 4 или 6 раз выше уровня, представленного в нормальной ткани.

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

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

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

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

В настоящем изобретении также предложен набор, включающий:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Контейнер терапевтического набора может быть флаконом, пробиркой, колбой, бутылкой, шприцем или любыми другими средствами, заключающими в себе твердое вещество или жидкость. Обычно, если имеется более одного компонента, набор содержит второй флакон или другой контейнер, что позволяет произвести отдельное введение. Набор может также содержать другой контейнер для фармацевтически приемлемой жидкости. Лечебный набор будет предпочтительно содержать аппарат (например, одну или

более игл, шприцы, глазные пипетки, пипетки и т.д.), который обеспечивает введение веществ по изобретению, которые являются компонентами настоящего набора.

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

Так как пептиды по изобретению были выделены из клеток рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), медикамент по изобретению предпочтительно используется для лечения рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ).

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

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

В контексте настоящего изобретения термин "хранилище" относится к группе или набору пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в конкретном виде опухоли. Понятие "хранилище" не подразумевает, что конкретные пептиды, включенные в вакцину, были изготовлены заблаговременно и хранились в реальном помещении, хотя эта возможность также принимается во внимание. Во внимание определенно принимается тот факт, что пептиды могут быть изготовлены de novo для каждой производимой индивидуализированной вакцины, или могут быть получены заранее и находиться на хранении. Хранилище (например, в форме банка данных) состоит из опухолеассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались в опухолевой ткани пациентов с раком легких (в том числе НМРЛ и МРЛ) с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами МНС I класса и МНС II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами МНС I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), хранилище может содержать маркерные пептиды HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов положительного контроля, полученных "не из собственного" антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из "собственных" антигенов. И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

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

1. HLA-лиганды из злокачественного материала идентифицировали с помощью масс-спектрометрии.

2. Для идентификации экспрессированных в избытке генов в злокачественной ткани (рак легких (в том числе НМРЛ и МРЛ)) по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома.

3. Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, презентуемые в избытке или селективно презентуемые на опухолевой ткани, предпочтительно кодируемые селективно экспрессированными или экспрессированными в избытке генами, выявленными на этапе 2, считали подходящими TUMAP-кандидатами для мультипептидной вакцины.

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

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

6. В целях оценки того, может ли быть осуществима индукция *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, были проведены анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров, а также пациентов, больных раком легких (в том числе НМРЛ и МРЛ).

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

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

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

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

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

Помимо этого, или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием модели хранилища (банка данных) пептиды TUMAP могут быть идентифицированы у пациента *de novo* и затем быть включены в вакцину. В качестве одного примера: пептиды-кандидаты TUMAP могут быть идентифицированы у пациента с помощью (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или aberrантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или aberrантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера: могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную, не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белок участков (повторное секвенирование экзона). В этих целях экзонную ДНК из человеческих образцов фиксируют с помощью поставляемых изготовителем наборов для обогащения целевыми фрагментами, за чем следует секвенирование, например, с помощью системы HiSeq2000 (Illumina). В дополнение к этому опухолевую мРНК секвенируют для прямого количественного определения геной экспрессии и подтверждения того, что мутировавшие гены экспрессированы в опухолях пациентов. Считывание получен-

ных в результате миллионов последовательностей осуществляется алгоритмами программного обеспечения. Получаемый список содержит мутации и экспрессию генов. Опухольеспецифические соматические мутации определяют сравнением с вариантами зародышевой линии из МКПК и устанавливают приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища, и пептиды-кандидаты TUMAP, обладающие подходящей иммуногенностью, выбирают для включения в вакцину.

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

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

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

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

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

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

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

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

Пептиды по настоящему изобретению могут использоваться в анализе ответов лимфоцитов на действие этих пептидов, таких как Т-клеточные ответы или ответы в виде антител к пептиду или пептиду в комплексе с молекулами МНС. Данные ответы лимфоцитов могут использоваться в качестве прогностических маркеров для принятия решения о дальнейших этапах терапии. Данные ответы могут также использоваться в качестве суррогатных маркеров ответов в иммунотерапевтических подходах, направленных на индуцирование ответов лимфоцитов с помощью различных средств, например, вакцинации белком, нуклеиновыми кислотами, аутологичными материалами, адаптивным переносом лимфоцитов. В условиях, когда проводится генная терапия, в целях оценки побочных эффектов могут быть проанализированы ответы лимфоцитов на пептиды. Мониторинг реакций лимфоцитов может также быть ценным инструментом для обследований в рамках последующего наблюдения после трансплантации, к примеру, для выявления реакций "хозяин против трансплантата" и "трансплантат против хозяина".

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

Чертежи

На фиг. 1E-N представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях (черные точки). Верхняя часть: медианные показатели интенсивности МС-сигналов технических репликатов нанесены в виде точек для единичных положительных образцов нормальной ткани (серые точки) и опухолевых образцов (черные точки), на которых был обнаружен пептид. Опухолевые и нормальные образцы сгруппированы по органам происхождения, а на диаграммах размаха ("ящик с усами") представлены медиана, 25-й и 75-й процентиля (ящик) и минимум и максимум (усы) нормализованного уровня интенсивности сигнала для нескольких образцов. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска (клетки крови, кровеносные сосуды, головной мозг, печень, легкие: высокий риск; серые точки; органы репродуктивной системы, молочная железа, предстательная железа: низкий уровень риска, серые точки; все остальные органы: средний уровень риска; серые точки). Нижняя часть: относительная частота обнаружения пептида в каждом органе представлена в виде столбчатой диаграммы. Числа под графиком обозначают число образцов, на которых был обнаружен пептид из общего числа проанализированных образцов для каждого органа. Если пептид был обнаружен на образце, но по техническим причинам не могло быть проведено количественное определение, образец включали в данный график репрезентации частоты обнаружения, но в верхней части фигуры точку не обозначали.

На фиг. 1A-1B представлена избыточная презентация различных пептидов в раковых тканях HLA-A*24 в сравнении с панелью образцов нормальных тканей HLA-A*24 (N = 19 нормальных образцов, N = 94 опухолевых образцов). Ткани (слева направо): нормальные образцы: кров, сосуды (кровеносные сосуды); головн. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкие; почки; гипофиз. Опухолевые образцы: ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГКК: гепатоклеточная карцинома; НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (немелкоклеточный рак легких); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); МРЛ: мелкоклеточный рак легких. фиг. 1A) символ гена: URB1, пептид: LYQEILAQL (SEQ ID NO: 62), фиг. 1B) символ гена: SKAP5, пептид: VYPASKMFPFI (SEQ ID NO.: 65).

На фиг. 1C-1D представлена избыточная презентация различных пептидов в раковых тканях с серотипом HLA-A*02 в сравнении с панелью образцов нормальных тканей с серотипом HLA-A*02 (N = 469 нормальных образцов, N = 528 опухолевых образцов). Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; кров. сосуды (кровеносные сосуды); головн. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкие; жиров. ткань (жировая ткань); надпочечник; желчн. прот. (желчные протоки); мочев. п. (мочевой пузырь); КМ (костный мозг); пищевод; глаз; желчн. п. (желчный пузырь); голова и шея; почка; толст. киш. (толстый кишечник); ЛУ (лимфатический узел); нерв; подж. жел. (поджелудочная железа); паразит. (паразитовидная железа); брюшина; гипофиз; плевра; скел. мышца (скелетная мышца); кожа; тонк. киш. (тонкий кишечник); селезенка; желудок; шитов. жел. (щитовидная железа); трахея; мочеточник; молочн. жел. (молочная железа); яичник; плацента; предст. жел. (предстательная железа); семенник; вилочк. жел. (вилочковая железа); матка. Опухолевые образцы: ОМЛ: острый миелоидный лейкоз; РМЖ: рак молочной железы; ХГК: холангиоклеточная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; РКЖП: рак кардиального отдела желудка и пищевода; ГКК: гепатоклеточная карцинома; ПлККГШ: рак головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (немелкоклеточный рак легких); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ: рак яичника; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РПрЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечно-клеточная карцинома; МРЛ: мелкоклеточный рак легких; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак эндометрия и матки. фиг. 1C) символ гена: BMS1, пептид: VLYDKDAVYV (SEQ ID NO: 129), фиг. 1D) символ гена: GORASP2, пептид: NLWGGQGLLV (SEQ ID NO: 130).

На фиг. 1E-1F представлена избыточная презентация различных пептидов в раковых тканях с серотипом HLA-A*01 в сравнении с панелью образцов нормальных тканей с серотипом HLA-A*01 (N = 13 нормальных образцов, N = 40 опухолевых образцов). Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; голов. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкие. Опухолевые образцы: ГБМ: глиобластома; ГКК: гепатоклеточная карцинома; НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (немелкоклеточный рак легких); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); МРЛ: мелкоклеточный рак легких. фиг. 1E) символ гена: ZNF439, пептид: LLDISQKNLY (SEQ ID NO: 154), фиг. 1F) символ гена: MMP12, пептид: SADDIRGIQSLY (SEQ ID NO: 174).

На фиг. 1G-1H представлена избыточная презентация различных пептидов в раковых тканях с серотипом HLA-A*03 в сравнении с панелью образцов нормальных тканей с серотипом HLA-A*03 (N = 12 нормальных образцов, N = 28 опухолевых образцов). Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; кров. сосуды (кровеносные сосуды); голов. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкие. Опухолевые образцы: ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (немелкоклеточный рак легких); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких).

точный немелкоклеточный рак легких); МРЛ: мелкоклеточный рак легких. Фиг. 1G) символы генов: KRT81, KRT121P, KRT83, KRT85, KRT86, пептид: KLAEELEGALQK (SEQ ID NO: 202), фиг. 1H) символ гена: NDC80, пептид: SINKPTSER (SEQ ID NO: 457). На фиг. 1I-1J представлена избыточная презентация различных пептидов в раковых тканях с серотипом HLA-B*07 в сравнении с панелью образцов нормальных тканей с серотипом HLA-B*07 (N = 13 нормальных образцов, N = 36 опухолевых образцов). Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; кров. сосуды (кровеносные сосуды); голов. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкие. Опухолевые образцы: ГБМ: глиобластома; НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (немелкоклеточный рак легких); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ: рак яичника; МРЛ: мелкоклеточный рак легких. Фиг. 1I) символ гена: CTHRC1, пептид: SPQRLRGLL (SEQ ID NO: 291); фиг. 1J) символ гена: MANEA, пептид: RPHKPGLYL (SEQ ID NO: 475). На фиг. 1K-1L представлена избыточная презентация различных пептидов в раковых тканях с серотипом HLA-B*08 в сравнении с панелью образцов нормальных тканей с серотипом HLA-B*08 (N = 1 нормальный образец, N = 22 опухолевых образца). Ткани (слева направо): Нормальные образцы: легкие. Опухолевые образцы: ГБМ: глиобластома; НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (немелкоклеточный рак легких); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); МРЛ: мелкоклеточный рак легких. Фиг. 1K) символ гена: VPS13B, пептид: DIYQRALNL (SEQ ID NO.: 315), фиг. 1L) символ гена: ARID4A, пептид: LVKVKVLL (SEQ ID NO: 317). На фиг. 1M-1N представлена избыточная презентация различных пептидов в раковых тканях с серотипом HLA-B*44 в сравнении с панелью образцов нормальных тканей с серотипом HLA-B*44 (N = 15 нормальных образцов, N = 25 опухолевых образцов). Ткани (слева направо): Нормальные образцы: головн. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкие. Опухолевые образцы: ГБМ: глиобластома; НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (немелкоклеточный рак легких); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); МРЛ: мелкоклеточный рак легких. Фиг. 1M) символ гена: NUP155, пептид: SEKGVIVQVY (SEQ ID NO: 362), фиг. 1N) символ гена: CLSPN, пептид: SEIGKAVGF (SEQ ID NO: 489).

На фиг. 2A-2N представлены примеры профилей экзонной экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые экспрессированы в избытке в различных раковых образцах. Опухолевые (черные точки) и нормальные (серые точки) образцы сгруппированы по органам происхождения, а на диаграммах размаха ("ящик с усами") представлены медиана, 25-й и 75-й процентиля (ящик) и минимум и максимум (усы) значений RPKM. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска. FPKM = фрагментов на тысячу пар оснований на миллион картированных ридов. Нормальные образцы: клетки крови; кров. сосуды: кровеносные сосуды; головной мозг; сердце; печень; легкое; жировая ткань; надпочечник; желчн. прот.: желчные протоки; мочев. п.: мочевого пузыря; КМ: костный мозг; хрящ. ткань: хрящевая ткань; пищевод; глаз; желчн. п.: желчный пузырь; голова и шея; почка; толст. киш.: толстая кишка; ЛУ: лимфатический узел; нерв; подж. железа: поджелудочная железа; паразит.: паразитовидная железа; брюшина; гипофиз; плевра; скел. мышца: скелетная мышца; кожа; тонк. киш.: тонкая кишка; селезенка; желудок; шитов. жел.: щитовидная железа; трахея; мочеточник; молочн. жел.: молочная железа; яичник; плацента; предст. жел.: предстательная железа; семенник; вилочк. жел.: вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: ОМЛ: острый миелоидный лейкоз; РМЖ: рак молочной железы; ХГК: холангиоцелочная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГКК: гепатоклеточная карцинома; ПлККГШ: рак головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено: немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома; НМРЛдругие: немелкоклеточный рак легких; НМРЛплоск: плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких; РЯ: рак яичника; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РПРЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечно-клеточная карцинома; МРЛ: мелкоклеточный рак легких; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак эндометрия матки. Фиг. 2A) символ гена: ADAMTS12, пептид: QYDPTPLTW (SEQ ID No: 1), фиг. 2B) символ гена: MMP12, пептид: VWSNVTPKLF (SEQ ID No: 2), фиг. 2C) символ гена: MMP12, пептид: YVDINTFRL (SEQ ID No: 84), фиг. 2D) символ гена: KIF26B, пептид: TLYPYQISQL (SEQ ID No: 87), фиг. 2E) символ гена: CT83, пептид: NTDNNLAVY (SEQ ID No: 164), фиг. 2F) символ гена: LAMA1, пептид: VSDSECLSRV (SEQ ID No: 189), фиг. 2G) символ гена: KIF26B, пептид: KVKDTPGLGK (SEQ ID No: 203), фиг. 2H) символ гена: SP6, пептид: SLDGAARPK (SEQ ID No: 205), фиг. 2I) символ гена: PRAME, пептид: SPSVSQLSVL (SEQ ID No: 220), фиг. 2J) символ гена: MMP1, пептид: NPFYPEVEL (SEQ ID No: 222), фиг. 2K) символ гена: NLRP2, пептид: FNKRKPLSL (SEQ ID No: 298), фиг. 2L) символ гена: KIF26B, пептид: VASPKHCVL (SEQ ID No: 300), фиг. 2M) символ гена: MAGEA3, MAGEA6, пептид: MEVDPIGHVYIF (SEQ ID No: 320), фиг. 2N) символ гена: MMP12, пептид: QEMQHFLGL (SEQ ID No: 326).

На фиг. 3 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*02+ донора. CD8+ Т-клетки примирировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью Seq ID No. 520 (KIQEMQHFL, Seq ID NO: 520) (А, левая секция). После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами А*02/Seq ID 520 (А). Правая секция (В) представляет собой контрольное окра-

шивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 4 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*24+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-A*24 в комплексе с пептидом с последовательностью Seq ID No 504 (A, левая секция). После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*24/Seq ID No 504 (VYEKNGYIYF, Seq ID NO: 504) (A). Правая секция (B) представляет собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*24. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 5 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*01+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-A*01 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 153 (KLDRSVFTAY, Seq ID No. 153) (A, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 173 (RTEFNLNQY, Seq ID No. 173) (B, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров A*01/Seq ID No 153 (A) или A*01/Seq ID No 173. Правые секции (A и B) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*01. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов.

Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 6 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*02+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 89 (ILSTTMVTV, Seq ID No. 89) (A, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 88 (VQMVITEAQKV, Seq ID No. 88) (B, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров A*02/Seq ID No 89 (A) или A*02/Seq ID No 88 (B). Правые секции (A и B) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 7 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*03+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-A*03 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 208 (GLASRILDAK, Seq ID No. 208) (A, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 210 (ATSGVPVYK, Seq ID No. 210) (B, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров A*03/Seq ID No 208 (A) или A*03/Seq ID No 210 (B). Правые секции (A и B) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*03. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов.

Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 8 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*24+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-A*24 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 15 (KYALLLQDL, Seq ID No. 15) (A, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 11 (YYSKSVGFMQW, Seq ID No. 11) (B, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров A*24/Seq ID No 15 (A) или A*24/Seq ID No 11 (B). Правые секции (A и B) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными

комплексами пептида и A*24. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогли исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 9 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-B*07+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-B*07 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 225 (LPFDGPGGIL, Seq ID No. 225) (А, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 248 (IPNWARQDL, Seq ID No. 248) (В, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров В*07/Seq ID No 225 (А) или В*07/Seq ID No 248 (В). Правые секции (А и В) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и В*07. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогли исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов.

Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 10 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-B*08+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-B*08 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 299 (MAQFKEISL, Seq ID No. 299) (А, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 297 (RAQLKLVAL, Seq ID No. 297) (В, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров В*08/Seq ID No 299 (А) или В*08/Seq ID No 297 (В). Правые секции (А и В) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и В*08. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогли исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 11 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-B*44+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-B*44 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 325 (QEQDVLDLVQKY, Seq ID No. 325) (А, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 331 (EDAQGHIV, Seq ID No. 331) (В, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров из отдельных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты с В*44/Seq ID No 325 (А) или В*44/Seq ID No 331 (В). Правые секции (А и В) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и В*44. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогли исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

Примеры

Пример 1. Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентуемых на поверхности клетки.

Образцы тканей.

Опухолевые ткани пациентов были получены из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания); Университетской клиники г. Мюнхен (Мюнхен, Германия). Нормальные ткани были получены из компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); BioServe (Белтсвилл, Мэриленд, США); Capital BioScience Inc. (Роквилл, Мэриленд, США); Центра клинической трансфузиологии г. Тюбингена (Тюбинген, Германия); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Медицинского университета префектуры Киото (КРUM) (Киото, Япония); Осацкого городского университета (ОСУ) (Осака, Япония); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания), Университетской клиники г. Женева (Женева, Швейцария), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия), Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия); Университетской клиники г. Мюнхен (Мюнхен, Германия). Перед проведением хирургического операции или аутопсии было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после удаления ткани были подвергнуты шоковой заморозке и хранились до выделения TUMAP-пептидов при температуре -70°C или ниже.

Выделение пептидов HLA из образцов тканей.

Пулы пептидов HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были получены методом иммунопреципитации из плотных тканей в соответствии с незначительно измененным протоколом (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) при использовании HLA-A*02-специфического антитела BB7.2, HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, HLA-DR-специфического антитела L243 и специфического к HLA-DP антителу B7/21, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

Масс-спектрометрический анализ.

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазовой хроматографией (nanoAcquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридных масс-спектрометрах LTQ-velos и -fusion (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленного кварца (75 мкм в/д × 250 мм) с обращеннофазовым сорбентом 1,7 мкм C18 (Waters) с применением скорости потока в 400 нл в минуту. Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10 до 33% растворителя В при скорости потока 300 нл в минуту. Для создания градиента использовали растворитель А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворитель В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник нано-ESI. Масс-спектрометры LTQ-Orbitrap работали в информационно-зависимом режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на спектрометре Orbitrap ($R = 30\,000$), затем следовало сканирование MS/MS также на Orbitrap ($R = 7500$) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Тандемные масс-спектры были интерпретированы с помощью программ SEQUEST с фиксированным уровнем ложноположительных обнаружений ($q \leq 0,05$) и дополнительным контролем в ручном режиме. В случае, если идентифицированная последовательность пептида была неопределенной, ее дополнительно подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

Относительное количественное определение методом ЖХ/МС без изотопных меток проводили путем подсчета ионов, т.е. с помощью экстракции и анализа результатов ЖХ/МС (Mueller et al., 2007). Этот метод основан на предположении, что площадь пика ЖХ/МС сигнала пептида коррелирует с его концентрацией в образце. Извлеченные характеристики обрабатывали с помощью деконволюционного анализа состояния заряда и путем выравнивания времени удерживания (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Наконец, все результаты спектров ЖХ/МС были сопоставлены методом перекрестных ссылок с результатами по идентификации последовательности, чтобы объединить количественные данные различных образцов и тканей в профили презентации пептидов. Количественные данные были нормализованы с применением двухуровневой системы в соответствии с центральной тенденцией с целью учета вариативности внутри технических и биологических повторных измерений. Таким образом, каждый идентифицированный пептид может быть ассоциирован с количественными данными, позволяющими провести относительную количественную оценку образцов и тканей. Кроме того, все количественные данные, полученные для пептидов-кандидатов, были проконтролированы вручную в целях обеспечения взаимной согласованности данных и для проверки точности автоматического метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариативность репликатов. В профиле сравниваются образцы раковой ткани с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации пептидов, в отдельности или исключительно презентуемых в избытке на опухолях, показаны на фиг. 1.

В табл. 8 показана презентация выбранных пептидов при различных раковых заболеваниях и, таким образом, конкретная значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных раковых заболеваний (например, пептида с последовательностью SEQ ID No. 3 для гепатоклеточной карциномы, пептида с последовательностью SEQ ID No. 11 для меланомы, рака яичника и рака матки).

Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов по изобретению среди различных видов

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
3	YLEKFYGL	ГКК
6	KYKDYFPVI	ГКК
9	RILRFPWQL	МЕЛ
11	YYSKSVGFMQW	МЕЛ, РЯ, РЭМ
13	HYTYILEVF	РЖ, РЭМ
14	SYSSCYSF	РЖ
18	DYIGSVEKW	РПрЖ
19	ILKEDPFLF	РЯ, ПКК
21	SYEVRSTF	ХГК, РЯ, РПрЖ
22	TQPGDWTLF	МЕЛ
23	KFIISDWRP	МЕЛ
24	MYPDLSELLM	ОМЛ, ГБМ, РЯ, РЭМ
26	KTPTNYLFL	РЖ
28	YYSIISHTL	ГКК
31	QYQNVLTW	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, ПКК, РЭМ
32	SLPDLTPTF	РПрЖ
33	KSSVIASLLF	ГБМ
34	MQPRMFFLF	ОМЛ, ГБМ, ГКК, МЕЛ, РЭМ
36	KQMEDGHTLF	ОМЛ, РЯ
37	QWPWQASLQF	РЖ
38	KYTNWKAFL	ОМЛ, ГКК
41	VIYFMGAIF	ГКК, РПрЖ, РЭМ
43	IQMDEPMAF	ОМЛ, МЕЛ, РЯ
44	AYLSAVGTF	ОМЛ, РЖ, МЕЛ
45	KYFVPPQLF	РЖ
47	KYADYFLEV	ГБМ, РЯ, РЭМ
48	VFIDHPVHLKF	РЭМ

045010

50	SYPELVKMWV	ОМЛ, РЖ, ГКК
51	KYALLLQEL	ОМЛ, ХЛЛ, ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РЯ, РПрЖ, ПКК, РЭМ
52	KYMKIFHKF	РЯ, РЭМ
53	KYITNLEDL	РПрЖ
54	LLIKLLQTF	ОМЛ, ГБМ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ, ПКК
55	RWMDQRLVF	РЖ, ГКК, МЕЛ, РЭМ
56	VYMIERLEL	ГБМ, НХЛ
57	YPSIIQEF	ГБМ, ПКК
58	QFAAPLRGIYF	ГБМ, ГКК
59	KYSTTFFMV	ГБМ
60	TYLSIFDQL	ОМЛ, РЖ, ГКК, РЯ
61	NYAENILTL	ОМЛ, ГБМ, РЖ, МЕЛ
62	LYQEILAQL	ОМЛ, ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РПрЖ, ПКК
63	VMPSDSFFF	МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
64	NYAIFDEGHML	ГБМ, РЖ
65	VYPASKMFPI	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
66	IYFRDSSF	ОМЛ, РЖ, МЕЛ
67	RYPGKFYRV	РЯ
68	IYQQIIQTY	РЖ, МЕЛ, РЭМ
69	IMPEKFEFW	ОМЛ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЭМ
70	PYTNVTFDF	РЖ, МЕЛ
71	SYMVLAPVF	МЕЛ
72	RYEGILYTI	РЖ, ГКК, НХЛ, РПрЖ
73	SYIGLPLTL	РЖ, ГКК, ПКК
74	VYDQYFITL	ОМЛ, РПрЖ
76	WYGWHFPEL	ОМЛ, РЖ, ГКК, ПКК, РЭМ
77	AYTLLGHEFV	РЖ, МЕЛ, РЯ
78	TWFPKTPMLF	ОМЛ, ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РЭМ
79	RYLADLPTL	РЖ, ГКК, РЯ, РЭМ
80	YYSPLRDLL	МЕЛ
82	RFLPSPVVI	ОМЛ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РПрЖ, РЭМ
83	TYCQNIKEF	ОМЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
84	YVDINTFRL	ГКК
86	FVIDGFDEL	КРК, РЖ, НХЛ, РП
87	TLYPYQISQL	ГКК, РП
90	FLLMHPSI	ХЛЛ, ГКК, ПКК
91	FALPGLLHA	РЖ, ГКК, НХЛ, РП, ПКК
92	NLRDLLSEV	ГКК
93	TLQEKILQV	ХЛЛ, ГБМ, НХЛ
95	ITIGVLARV	КРК, РПрЖ
96	HLVGGLHTV	ОМЛ, РМЖ, КРК, РЖ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ

045010

97	VLALVNSTV	ХЛЛ
98	LQSSGLTLLL	ГБМ, РЯ, РПрЖ
99	FLKEKVPGI	ХЛЛ, РЖ, МЕЛ, НХЛ
100	RQYRTPFQL	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, ГБМ, НХЛ, РЯ, ПКК
101	FIISDWRFVL	ПлКГШ
102	SLLEQAIAL	РЖ, ГКК, НХЛ, РЯ, РЭМ
103	FLYYPDPVL	РЖП, ГКК, МЕЛ, НХЛ
105	SLLTHIPTA	ОМЛ, КРК, ПлКГШ, МЕЛ, РЯ, РП, ПКК, РМП, РЭМ
106	FIIDTTYPAYV	КРК, РЯ, РП
107	LLQGAIESV	РМЖ, ХЛЛ, КРК, ПлКГШ, МЕЛ, НХЛ, РМП, РЭМ
108	MIIALSLYI	ОМЛ, РМЖ
110	LLADFQALL	ПКК
111	ALCLLLHLL	ОМЛ, РЖП, ГКК, ПлКГШ, ПКК
113	AVLTGLVEV	РМЖ, ХЛЛ, КРК, РЖ, ГКК, НХЛ, РП, ПКК, РЭМ
114	ILDERQVLL	ОМЛ, РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлКГШ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПЖ, РМП, РЭМ
115	MLLETQDALYV	ПлКГШ
116	VLMEENSKL	ГБМ
117	FLDPNARPLV	НХЛ, РЯ
118	ALSSVLHSI	ОМЛ, РМЖ, КРК, РЖП, ГКК, ПлКГШ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, РМП
119	RTADITVTV	ОМЛ, КРК, РМП
120	ALLANLPAV	РЖП, РЖ, РЯ, РПЖ
121	ALVDTLTGI	ПлКГШ, НХЛ, РЭМ
122	ALLEMFPEITV	РМЖ, РЯ, РПрЖ
123	LMAFFLAVV	ХГК, ГКК, НХЛ, РП, ПКК
124	SVASVLLYL	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, ГКК, ПлКГШ, НХЛ, РЯ
125	VLQPFLPSI	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, ГКК, ПлКГШ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, ПКК
126	FLSTVTSV	ХГК, ГБМ, ГКК, ПлКГШ, МЕЛ, НХЛ, РП, РПЖ, ПКК, РМП, РЭМ
127	GLDGSLVFL	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, ГБМ, ГКК, ПлКГШ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РМП
128	FLGTTPTL	ОМЛ, ХЛЛ, ГБМ, ПлКГШ, НХЛ, РЯ, РМП, РЭМ
129	VLYDKDAVYV	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, ПлКГШ, НХЛ, РЯ, РМП, РЭМ
130	NLWGGQGLLGV	РМЖ, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, РЯ, РПрЖ, РЭМ
131	LLKEFVQRV	РМЖ, КРК, ГКК, ПлКГШ, РЯ, РП
132	ALWLVDPLTV	ХЛЛ, КРК, ГБМ, ГКК
133	MTLPVDAVISV	ХЛЛ, КРК, ГКК, ПлКГШ, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
134	AAEIGDKSWLY	РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЭМ
135	ASEDSVLLY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РП, РПрЖ,

045010

136	ATDLVVLDRY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РП, РПрЖ, РЭМ
137	ATSKFMEFY	ГБМ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
139	ECDMAFHIY	МЕЛ, РЯ
140	ESDREELNY	РЖ, РПрЖ
141	ESDVGWVY	ГБМ, РЖ
142	EVAEPSVLFDLY	РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
144	FLDSQNLSAY	РЖ
145	FVDKPVAY	ГБМ, РЖ, МЕЛ
146	GLNTGSALSY	РЖ, РЯ
148	GTEFTTILY	РЖ, НХЛ, РП, РПрЖ
149	GTEFTTVLY	РЖ, ПЛКГШ, МЕЛ, РП, РПрЖ
150	GTELLSLVY	РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
152	HTDSLHLLI	РЖ, МЕЛ, РЯ
154	LLDISQKNLY	ГБМ, НХЛ, РПрЖ
155	LLDPNPHMY	РПрЖ
156	LLDSLREQY	РЖ, НХЛ, РП
157	LMDRPIFY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ
159	LSDTSVIQFY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ
160	LTEAVLNRY	РЯ
161	LVDDGTHGQY	ГБМ, РЖ, МЕЛ
162	LVDNSIRELQY	РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
163	NSDSSLTLREFY	ГКК, РПрЖ
166	NTQITDIGRY	МЕЛ
167	QSDPGTSVLGY	ГБМ
169	RLDTPLYFSY	МЕЛ, РЯ
170	RSDDTAVYY	ХЛЛ, РЖ, ГКК, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
172	RTDSCSSAQAQY	МЕЛ
173	RTEFNLNQY	РЖП, РЖ, МЕЛ, РЭМ
177	SSDEVNFLVY	РЖ, МЕЛ, РЯ, РЭМ
178	SSDSSTLPKL	РЖ, РЯ, РПрЖ
179	STAKSATWTY	РПрЖ
180	STDPWIQMAY	ГБМ, РЖ, МЕЛ
181	TADGKTYYY	ГБМ, ГКК, МЕЛ, РПрЖ
182	TDYHVRVY	ГБМ, РПрЖ
184	TSAHPEDSSFY	РЖ, НХЛ, РПрЖ
186	TTDIIKEY	РЖ, МЕЛ,
187	VADLHLYLY	РЖ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ, ПКК
190	VTDGINPLIDRY	МЕЛ
191	VDGSLYEGVAY	РЖ, МЕЛ, РЭМ
192	VTEESFDSKFY	РЖ
193	VTEFSLNTY	РЖП, РЖ, МЕЛ, РЯ, РП, РЭМ
196	WMFFVINY	РЭМ

197	YADTVRPEFY	РЯ
198	YLDPVQRDLY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
202	KLAELEGALQK	МЕЛ, РЯ, РЭМ
204	AVFDKFIRY	ГБМ
207	RSFNGLLTMY	МЕЛ, РЯ
210	ATSGVPVYK	РЭМ
211	TVNPVAIHK	ГБМ, НХЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
212	KAYEQVMHY	РЭМ
213	LNINMTSPMGTK	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РПЖ
214	RTMSEAALVRK	РЖ, НХЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
215	MMFSGPQILKL	МЕЛ
216	KLYAWELAF	ОМЛ, ГБМ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ
217	RILNQILYY	ОМЛ, ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
218	KTLVAELLILK	ОМЛ, НХЛ, РЭМ
219	RLRSSLVFK	РЭМ
220	SPSVSQLSVL	РЭМ
235	MPLKHYYLL	МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
237	RPAATAVISL	ГБМ, НХЛ, РЯ
244	FPYVRDFVM	РЖП, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
247	RALLARLLL	НХЛ
251	VPRSSGQTV	РМЖ, ГБМ, РЭМ
255	MPLLENLYL	РЯ, РЭМ
256	SPRVPSIEL	НХЛ
259	RPPAAGLRGISL	ГБМ
260	YPQHPLNA	РМЖ, ГБМ, РЖ, НХЛ
262	SAYPQRLEI	РЖ
263	HPAPYGDLL	РЭМ
271	MPLPWSLALP	МЕЛ
273	MPLLWLRGF	РЭМ
274	TPYQEHVAL	РЯ
275	APHPPLSVV	ОМЛ, РМЖ, МЕЛ
276	LPRAGGAFI	НХЛ, РЯ, ПКК, РЭМ
277	MPLFEPRVF	РЯ, РЭМ
278	HPMIDINGIIVF	РЭМ
280	VPISEEGTPVL	МЕЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
281	RPRAPVTPA	ГБМ
282	MPQIETRVIL	РЭМ
283	RPHSLSSEL	ОМЛ, НХЛ
284	FPVTSIFHTF	МЕЛ, РЯ, РЭМ
285	FPSFLTNSL	ОМЛ
286	VPTLRSEL	РЯ
288	FPQKFIDLL	РЭМ

289	VPENHSVAL	РЭМ
290	APYRPPDISL	РМЖ
292	SPQRLRGLLL	НХЛ
293	RPRSALPRLLLP	НХЛ, РЭМ
295	KPEGTRIAV	НХЛ, РЭМ
296	MPMQDIKM	РЭМ
300	VASPKHCVL	РЯ
301	YMHKLLVL	ОМЛ, НХЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
305	ALKLRVAVL	НХЛ
306	ILKVKVGL	МЕЛ, РЯ
308	MLKQKVEEL	РП
311	EIRIRVVQM	МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПрЖ
313	ELKKKEYEEL	НХЛ
314	AIISRLVAL	НХЛ, РП, РМП
316	VIKEKALTL	НХЛ, РЯ, РПрЖ, ПКК
318	EAAIRSVEL	ГБМ, МЕЛ, НХЛ, РЯ
321	AEMLESVIKNY	НХЛ
322	KEVDPAGHSY	НХЛ
323	SEFMQVIF	НХЛ
328	FEYDFLLQRI	РЭМ
330	KEGDLGGKQW	НХЛ
335	KELEATKQY	МЕЛ, НХЛ
337	TENRYCVQL	ГКК
342	HEFSSPSHL	НХЛ
343	TEFTTVLY	ГБМ, НХЛ, РПрЖ
345	IEFIHPQAF	ГБМ, РЖ, НХЛ, РПрЖ
347	ALNPYQYQY	РЭМ
348	AEIQGNINHV	РЭМ
351	EEVNYINTF	ОМЛ, МЕЛ, НХЛ, РЯ
354	TEDPTILRI	РЖ, ГКК, РЯ, РПрЖ, РЭМ
356	EEGRVYLF	ГБМ, РПрЖ
357	RELENCFQIQ	РЭМ
359	DELFSIALY	НХЛ
363	AELDKLTSV	ГБМ, РЭМ
366	AENLFRAF	ГБМ, НХЛ, РЯ
367	GEVHPSEMI	РЭМ
368	GEFPVRVQV	ОМЛ, РЖ, РЯ, РЭМ
370	YEDLSQKY	ГБМ, НХЛ, РЯ
371	GELALKKKI	РЭМ
372	TEGIIMKDF	РЯ, РПрЖ, ПКК, РЭМ
373	MEMQKSPVF	НХЛ, РЯ
374	DEVNFLVY	ХГК, РЖП, ГБМ, НХЛ, РЯ, РПрЖ

045010

375	VYSDLHAFYY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РПрЖ
376	KYVKDFHKF	ОМЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
377	VYVGAVNRI	РЖ, ГКК, РПрЖ
378	KFLGPAEHLTF	РЯ
379	NYIVPDKQIF	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РЯ, РПрЖ
380	VFQEKHHVI	РПрЖ
381	TYSKKHFR I	МЕЛ, РЯ
382	IYHSHHPTL	ОМЛ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
383	RYKQDVERF	ОМЛ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
384	KYVKVFDKF	ОМЛ, РЭМ
385	MYINEVERL	ГБМ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
386	VYNDHSIYVW	ОМЛ, ГБМ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
387	RWL PQKNAAQF	ОМЛ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РЯ, ПКК, РЭМ
388	FSIPEGALVAV	ОМЛ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлкГШ , МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПрЖ, ПКК, РМП, РЭМ
389	TLMEQPLTTL	ОМЛ, РМЖ, КРК, ГКК, ПлкГШ , НХЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
390	HIMPTVHTV	РМЖ, ХЛЛ, ГБМ, ГКК, ПлкГШ , МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РМП, РЭМ
391	SLIDMRGIETV	РМЖ, ХЛЛ, ГБМ, ГКК, ПлкГШ , РЯ, РМП
392	SLFKDQMEL	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, КРК, ГБМ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПрЖ, ПКК, РМП, РЭМ
393	ILLPYLQTL	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, КРК, ГБМ, ГКК, ПлкГШ , НХЛ, РЯ
394	ASEAEMRLFY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ
395	ASEASRLAHY	ГБМ, РЖ, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
396	ASEFGNHLY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, РЭМ
397	ASEITSGASLY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РЯ, РПрЖ
398	ASEQQALHTVQY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
399	ATDIPCLLY	МЕЛ
400	ATDISRQNEY	ГБМ, РЖ, НХЛ, РЯ
401	DSDESYMEKSLY	РЖ
402	DTDSQRLAY	ГБМ, РЖ, МЕЛ
403	ELDSKVEVLTY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ
404	ETARKFLYY	ГБМ
405	ETEEGIYWRY	РЖ
406	ETEQTKFWDY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, РЯ, ПКК, РЭМ
407	FSDNDKLYLY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
408	FTEQWTDGY	ГБМ, РЖ, РЯ, РП, РПрЖ,
409	FVDPLVTNY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПрЖ, ПКК
410	GSDHQSPSSSSY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, РЯ, РПрЖ,
411	GTVYEDLRY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП
412	ILDEVIMGY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП

045010

413	ISDRYYTALY	ГБМ, РЖ, РПрЖ, РЭМ
414	KTDESLTKY	РЖ, НХЛ, РПрЖ
415	LLDPRSHTY	РЖ, НХЛ
416	LLDTAQKNLY	ГБМ, НХЛ, РПрЖ
417	LLEDKHFQSY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
418	LSDPSGPKSY	ГБМ, ГКК, РПрЖ
419	LSELKPMYSY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РП, РПрЖ, ПКК, РЭМ
420	LTEDKETLQY	РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ
421	LTELLERAAFY	РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЭМ
422	MIDVTKSY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПрЖ, РЭМ
423	NLDAVHDITVAY	РЖ, МЕЛ, РПрЖ, РЭМ
424	NLDEEKQLLY	МЕЛ, РПрЖ
425	NLDIIQQEY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПрЖ, РЭМ
426	NLDQATRVAY	НХЛ
427	NSDEQKITEMVY	РЖ
428	NSELSCQLY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, ПКК
429	NTESSMSGYLY	РЖ, МЕЛ,
430	NTEGLHHLY	ГБМ, ГКК, МЕЛ, РПрЖ
431	NTSDMMGRMSY	РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ,
432	NVDPVQHTY	ГБМ, РЖ, ГКК, ПлКГШ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПрЖ, ПКК, РЭМ
433	QIDTGENLY	РЖ, МЕЛ
434	QTDCAPNNGY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, РПрЖ
435	QTDDTWRTY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ
436	QTETGTPYMLY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПрЖ, РЭМ
437	STDGKHWWY	РЖ, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ
438	STDNFNCKY	РЖ, ГКК, МЕЛ
439	TLDAGKFQIY	РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
440	TLDENPGVRY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, РЭМ
441	TLDSALNAASY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, ПКК
442	TSDFSRFTNY	ГБМ
443	TTDFPSESSFY	РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ
444	TTDTVIRSY	РЖ, МЕЛ, РЭМ
445	VLDQGKITEY	ГБМ, ГКК
446	VTAQVVGTERY	РЖ, МЕЛ
447	VVDEHELIY	ГБМ
448	YLDIPNPRY	ГБМ, МЕЛ, ПКК
449	YLDRTGNVSFY	ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, РПрЖ, ПКК
450	YSDDGQKWTY	МЕЛ
451	YSDSLVQKGY	ГБМ, РЖ, ГКК, РЯ, РПрЖ, РЭМ
452	YVDAVLGKGHQY	ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПрЖ, РЭМ

453	AINTSIKNK	РПрЖ
454	KVYTPSISK	ГБМ, ГКК, МЕЛ, РЭМ
455	RIADIFVKK	РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
456	SMFTAILKK	ОМЛ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РЭМ
457	SINKPTSER	ГБМ
458	GIADFLVKY	ОМЛ, РМЖ, ГБМ, МЕЛ, НХЛ, РЭМ
461	RPILIVTL	НХЛ
464	YPRPGTPAA	ОМЛ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, ПКК
465	VPRPIFSQL	НХЛ
468	SPMYGQAGL	ПКК
469	YPENGVVQM	ОМЛ, РЯ
470	SPNSYFRVL	ПКК
471	KPRPDVTNEL	НХЛ
472	NPRATDAQL	ОМЛ
473	LPRALLSSL	НХЛ, РЯ
474	LPRLLPAL	ОМЛ, НХЛ
476	AEIEIMKKI	НХЛ
477	QENSYQSRL	РЯ
479	AEIQPQTQV	РЭМ
480	GEVSGLTKDF	МЕЛ, НХЛ, РЯ
481	RELQHEHSL	РЯ
482	TEREWADEW	ОМЛ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, ПКК
483	EENDQSTHKW	МЕЛ, НХЛ, РЯ, ПКК, РЭМ
484	AEVGFVRF	ОМЛ, МЕЛ, НХЛ, РЯ
485	SEIEDSTKQVF	МЕЛ, НХЛ, РЯ
486	SEDDPILQI	НХЛ, РЯ, РЭМ
487	AEDQLHHSF	ОМЛ, НХЛ
488	TEFPIIKMY	ОМЛ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПрЖ

ОМЛ = острый миелоидный лейкоз, РМЖ = рак молочной железы, ХГК = рак желчных протоков, ГБМ = рак головного мозга, ХЛЛ = хронический лимфоцитарный лейкоз, КРК = колоректальная карцинома, РП = рак пищевода, РЖП = аденокарцинома желчного пузыря, РЖ = рак желудка, ПлКГШ = плоскоклеточная карцинома головы и шеи, ГКК = гепатоклеточная карцинома, МЕЛ = меланома, НХЛ = неходжкинская лимфома, РЯ = рак яичника, РПЖ = рак поджелудочной железы, РПрЖ = рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, ПКК = почечно-клеточная карцинома, РМП = рак мочевого пузыря, РЭМ = рак матки.

Пример 2. Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению.

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

Источники и приготовление РНК.

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

Суммарная РНК здоровых тканей человека для экспериментов по секвенированию РНК (RNASeq) была получена из: Компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия); BioServe (Белтсвилл, Мэриленд, США); Capital BioScience Inc. (Роквилл, Мэриленд, США); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Университетской клиники г. Гейдельберг (Торакальная клиника, Гейдельберг, Германия); Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Неаполь, Италия); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США).

Суммарная РНК опухолевых тканей для экспериментов RNASeq была получена из: компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Geneticist Inc. (Глендейл,

Калифорния, США); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания); Университетской клиники г. Бонн (Бонн, Германия); Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия) Качество и количество всех образцов РНК оценивали на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Вальдбронн, Германия) с использованием набора RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Эксперименты по секвенированию РНК.

Анализ экспрессии гена в образцах РНК опухолевой и нормальной ткани проводили способом секвенирования следующего поколения (RNAseq) лабораторией СеGaТ (Тюбинген, Германия). Вкратце, библиотеки секвенирования подготавливали при использовании набора реактивов Illumina HiSeq v4 согласно протоколу производителя (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), в который входит фрагментация РНК, синтез кДНК и добавление адаптеров секвенирования. Библиотеки, полученные из многочисленных образцов, смешивали в эквимольном соотношении и секвенировали на системе компании Illumina HiSeq 2500 согласно инструкциям производителя, получая одноконцевые риды длиной 50 пар оснований. Обработанные риды картируют на человеческий геном (GRCh38) с помощью программного обеспечения STAR. Данные по экспрессии представляют на уровне транскриптов в виде RPKM (число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион картированных ридов с помощью программного обеспечения Cufflinks) и на уровне экзонов (общее число ридов, получаемых с помощью программного обеспечения Bedtools), на основании идентификаций по банку данных последовательностей ensembl (Ensembl77). Для получения значений RPKM риды экзонов нормализованы по длине экзона и размеру выравнивания.

Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в клетках рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ), представлены на фиг. 2. Показатели экспрессии других отдельных генов показаны в табл. 9.

Таблица 9

Показатели экспрессии					
SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена			
		НМРЛадено	НМРЛплоск	НМРЛдругие	МРЛ
1	QYDPTPLTW	+++	+++	+	+
2	VWSNVTPCLKF	+++	+++	+	+++
3	YLEKFYGL	+++	+++		+++
4	SYEKVINYL		+++		+++
5	RYMKKDYLI				+++
6	KYKDYFPVI	+	+++		++
7	VQQWSVAVF		+++		
8	PFLPPAACFF				+++
9	RILRFPWQL	+++	++		
10	VWSDVTPLNF	++	+++		
11	YYSKSVGFMQW				++
12	STIRGELFFF	++	++		
13	HYTYILEVF	++	++		
14	SYSSCYSF		++		
15	KYALLLQDL		+		++
16	TYNPDFSSL				++
17	YYADKKTIVL	+	++	+	
18	DYIGSVEKW	+	+		
19	ILKEDPFLF	+			
20	EFTTVLYNF		+		
21	SYEVRSTF	+	+		+
22	TQPGDWTLF	+			
23	KFIISDWRF	+			

045010

24	MYPDLSELLM			+	+
25	SYNGYVFYL	+		+	
26	KTPTNYYLF		+		
27	NYTLYPITF				+
28	YYSIISHTL	+		+	
29	VYPLLSRLYW	+		+	
30	QYLPGWTVLF	+			
31	QYQNVLTWL		+		
32	SLPDLTPTF	+	+		
33	KSSVIASLLF		+		
34	MQPRMFFLF	+	+		
35	KYLEESWWL				+
36	KQMEDGHTLF				+
37	QWPWQASLQF				+
38	KYTNWKAFI				+
39	LIFMLANVF		+		
40	QYEPPSAPSTTF				+
41	VIYFMGAIF		+		
42	TLPNTIYRF	+		+	
43	IQMDEPMAF				+
44	AYLSAVGTF		+		
45	KYFVPPQLF	+			
46	AFPVTSIFHTF		+		+
47	KYADYFLEV				+
48	VFIDHPVHLKF				+
49	LYISEVRNI		+		
50	SYPELVKMWW				+
51	KYALLLQEL				+
52	KYMKIFHKF				+
53	KYITNLEDL				+
54	LLIKLLQTF				+
55	RWMDQRLVF		+		
56	VYMIEPLEL		+		
57	YPSIIQEF				+
84	YVDINTFRL	+++	+++	+	+++
85	YIDFQSLV				++
86	FVIDGFDEL	++	++		++
87	TLYPYQISQL	++	++	+	++
88	VQMVITEAQKV	++	++		
89	ILSTTMVTV	++	++	+	+
90	FLLMHPSI				++

045010

91	FALPGLLHA	++	++		
92	NLRDLLSEV	++	++	+	+
93	TLQEKILQV				++
94	VLPDIETLIGV		++		++
95	ITIGVLARV	++			
96	HLVGGHLTV				+
97	VLALVNSTV				+
98	LQSSGLTLLL	+	+		+
99	FLKEKVPGI				+
100	RQYPTPFQL		+		+
101	FIISDWRFVL	+			
102	SLLEQAIAL				+
103	FLYYDPVL		+		
104	GMLDIFWGV				+
105	SLLTHIPTA				+
106	FIIDTTYPAYV	+			
107	LLQGAIESV				+
108	MIIALSLYI	+	+		
109	LLGSIGLLGV	+			
110	LLADFQALL				+
111	ALCLLLHLL				+
112	SVSDGIHSV		+		
113	AVLTGLVEV				+
114	ILDERQVLL		+	+	
115	MLETQDALYV	+	+		
116	VLMEENSKL		+		
117	FLDPNARPLV				+
118	ALSSVLHSI	+			
119	RTADITVTV		+	+	
120	ALLANLPAV	+		+	
121	ALVDTLTGI				+
122	ALLEMFPEITV				+
123	LMAFFLAVV				+
124	SVASVLLYL		+		
138	DSDSCHFNY	++			
139	ECDMAFHIY				+
140	ESDREELNY				+
143	FIDYPPKEDY	++	+		
146	GLNTGSALS	++	+		
147	GSSDSSTLPKL		+		
148	GTEFTTILY				+

045010

149	GTEFTTVLY		+		
150	GTELLSLVY		+		
153	KLDRSVFTAY				++
155	LLDPNPHMY	+			++
158	LSDLLKQGY			++	+
160	LTEAVLNRY	++	++	+	++
163	NSDSSLTLREFY	+			+
164	NTDNNLAVY	+++	+++		+
165	NTDPTAPPY	+	+		
166	NTQITDIGRY	+	+		
167	QSDPGTSVLGY				+
168	QTDHPQPILDY		+	++	
171	RSDPVTNLVLY	++			
172	RTDSCSSAQAY	+			
174	SADDIRGIQSLY	+++	+++	+	+++
175	SDVTPLTF	+++	++		
176	SRTINVSPLY		+		+
177	SSDEVNFLVY		+	+	
178	SSDSSTLPKL		+		
179	STAKSATWTY		++		
183	TLEDIATSHLY				+
185	TSDSNLNKY				++
188	VSDAKLDKY				+
189	VSDSECLSRV		+++		+++
190	VTDGINPLIDRY				++
192	VTEESFDSKFY				+
193	VTEFSLNTY	++	+		
194	VVADTKMIEY	++	+		
195	VVDSVGGYLY	+		++	
199	YLPQHTIETY		+		
200	YSEDEVTKY		+		++
201	YVGKEHMFY		+++		+++
202	KLAELEGALQK	+++	+		
203	KVKDTPGLGK	++	++	+	+
204	AVFDKFIRY				++
205	SLDGAARPK	+	+		++
206	KLIDLSQVMY	+			
207	RSFNGLLTMY	+	+		
208	GLASRILDAK	+	+		
209	RTQIPMSEK				+
210	ATSGVPVYK	+			+

045010

211	TVNPVAIHK		+		
212	KAYEQVMHY				+
213	LNINMTSPMGTK				+
214	RTMSEAAVLRK				+
215	MMFSGPQILKL		+		
216	KLYAWELAF		+		
217	RILNQILYY	+			
218	KTLVAELLILK		+		+
219	RLRSSLVFK		+		
220	SPSVSQLSVL	++	+++		+++
221	VPDVAQFVL	+++	+++		
222	NPFYPEVEL	+++	+++		
223	YPKDIYSSF	++	+++		
224	GPQPWHAAL	+++	++		+
225	LPFDGPGGIL	+++	++		
226	SPRMSGLLSQT				+++
227	YPRGNHWAVGH				+++
228	YPRGNHWAVGHL				+++
229	VPLPAGGGTV				+++
230	VPLPAGGGTVL				+++
231	RPRALRDLQL	+	++		+
232	RPRALRDLQLL	+	++		+
233	KPYQGNPTF		++		
234	RAKNAGVTI	++	++		
235	MPLKHLLLL	++			
236	RVRGGEDGDRL				++
237	RPAATAVISL	++	++		
238	KGPPWAAF	++			
239	YVPSASLFML		+		++
240	SPREVTTVL	++			
241	SARLATDAL	++			
242	SPRWLPVSL				++
243	RPIENRILIL	+	++		
244	FPYVRDFVM	++	+		
245	RIREHVPQL	++	+		
246	TPLPAVIVL	+	++		
247	RALLARLLL	++	+		
248	IPNWARQDL		++	+	
249	VPSSRILQL		++		+
250	SPRDFLSGL				++
251	VPRSSGQTV	+	+		++

045010

252	SPDIRNTTV	++			
253	RVIDAVRFTL		++		
254	NPFPHLITL	+	+	+	
255	MPLLENLYL	+	+		
256	SPRVPSIEL		+		
257	LPRIPFADV	+	+	++	
258	LPRGPLASL	+	+		
259	RPPAAGLRGISL				+
260	YPQHPLNA		+		+
261	APSARVVC	+	+	+	
262	SAYPQRLEI	+			
263	HPAPYGDLL		+		+
264	RPILIIITL				+
265	SPRQPPRLV	+			
266	HAYPPGPGL		+		
267	HPELVNHIVF	+			
268	YPLFRGINL	+	+		
269	APRAPRLML	+			
270	APGPRFLVT	+	+		
271	MPLPWSLALP		+		
272	MPLPWSLALPL		+		
273	MPLLWLRGF	+	+	+	
274	TPYQEHVAL				+
275	APHPPLSVV				+
276	LPRAGGAFI	+	+		
277	MPLFEPRVF	+	+		+
278	HPMIDINGIIVF	+	+		
279	SPARASPAL	+			
280	VPISEEGTPVL				+
281	RPRAPVTPA				+
282	MPQIETRUIL		+		+
283	RPHLSSEL		+	+	
284	FPVTSIFHTF		+		+
285	FPSFLTNSL				+
286	VPTLRSEL		+		
287	APREEQQRSL				+
288	FPQKFIDLL				+
289	VPENHSVAL		+		
290	APYRPPDISL	+			
296	MPMQDIKM	+++	+++		+++
297	RAQLKLVAL		+++		

045010

298	FNKRKPLSL	+	++		+
299	MAQFKEISL	+	++		+
300	VASPKHCVL	++	++	+	+
301	YMHKLLVL				++
302	HLLQKQTSI		++		
303	LPPKFVTV	++			
304	ELKKLYCQI		+		
305	ALKLRVAVL				+
306	ILKVKVGL	+			
307	ILLPRTVSL	+	+		
308	MLKQKVEEL		+		
309	DAIQRYSC		+		
310	LPPKFFVL				+
311	EIRIRVVQM		+		
312	EAMLRNKEL				+
313	ELKKKEYEEL				+
314	AIISRLVAL	+			
319	AEMLERVIKNY	++	+++		+++
320	MEVDPIGHVYIF	+++	+++		+++
321	AEMLESVIKNY	+	+++		+++
322	KEVDPAGHSY		+++		+++
323	SEFMQVIF		+++		+++
324	TDSIHAWTF				+++
325	QEQDVDLVQKY	+++	+++		
326	QEMQHFLGL	+++	+++		+++
327	YEIEARNQVF	+++	+++		+++
328	FEYDFLLQRI	++	+++		+++
329	NEHPSNNW	++	+++		
330	KEGDLGGKQW	++	++	+	+
331	EDAQGHIW	++	++		
332	MEVPVIKI	+	++	+	++
333	AETLSTIQI	++	++		+
334	AEDEPAAAHL	++	++	+	+
335	KELEATKQY	++	++		+
336	ASSSGPMRWW	++	++		
337	TENRYCVQL		++		
338	SEGSEPALLHSW	++			
339	SEPALLHSW	++			
340	TEFSLNTY	++	+		
341	EEIEGKGSFTYF	++			
342	HEFSSPSHL		++		

045010

343	TEFTTVLY		+		
344	EEATGQFHVY	+			
345	IEFIHPQAF	+	+		
346	VEAPGPVHVYW	+	+		+
347	ALNPYQYQY				+
348	AEIQGNINHV				+
349	AEQDMRELTY		+		
350	GECDFKEIL	+			
351	EEVNYINTF				+
352	NEVLTYIKF		+		
353	GEIIMQNNW				+
354	TEDPTILRI		+		
355	SDMVRFHLLF		+	+	+
356	EEGRVYLF	+	+		
357	RELENCFQIQ				+
358	KEADIHFLI	+	+	+	
359	DELFICIALY				+
360	AEVPTGVII	+			
361	SENLFASF	+			
362	SEKGVIVQY				+
363	AELDKLTSV				+
364	AETPIQNVII	+			
365	SEMNVNMKY	+			
366	AENLFRAF		+		+
367	GEVHPSEMI		+		+
368	GEFPVRVQV		+		
369	EEIERFFKL				+
370	YEDLSQKY				+
371	GELALKKKI				+
372	TEGIIMKDF	+			
373	MEMQKSPVF				+
374	DEVNFLVY		+	+	
375	VYSDLHAFYY				++
376	KYVKDFHKF				+
377	VYVGAVNRI		+		
378	KFLGPAEHLTF	+			
388	FSIPEGALVAV		+		
389	TLMEQPLTTL				+
401	DSDESYMEKSLY				+
402	DTDSQRLAY				+
405	ETEEGIYWRY		++		

409	FVDPLVTNY				+
419	LSELKPMSY		+		
427	NSDEQKITEMVY				+
429	NTEDSSMSGYLY	+			
432	NVDPVQHTY	+			
438	STDNFNCKY	+	+		
442	TSDFSRFTNY				+
450	YSDDGQKWTVY	++			
454	KVYTPSISK				+
455	RIADIFVKK	+	+		
456	SMFTAILKK				+
457	SINKPTSER				+
458	GIADFVLKY				+
459	RPMQQAQAL		+++		
460	MPMAGDMNGL		++		
461	RPILIVTL		+		
462	RPFHTRATV	++	++	+	+
463	TPKAGPTL	++	++	+	+
464	YPRPGTPAA				+
465	VPRPIFSQL				+
466	APYKSVTSL	+	+		
467	KPFSSFTSM				+
468	SPMYGQAGL				+
469	YPENGVVQM				+
470	SPNSYFRVL				+
471	KPRPDVTNEL				+
472	NPRATDAQL				+
476	AEEEIMKKI	+++	+++	+	+++
477	QENSYQSRL	++	+++		
478	SEIEQEIGSL	++	++		
479	AEIQPQTQV	+	+		+
480	GEVSGLTKDF				+
481	RELQHEHSL	+	+		
482	TEREWADEW				+
483	EENDQSTHKW		+		
484	AEVGFVRFF				+
485	SEIEDSTKQVF				+
486	SEDDPILQI				+
487	AEDQLHHSF				+
488	TEFPILKMY				+
489	SEIGKAVGF				+

В таблице представлены пептиды, полученные из генов, которые в очень высокой степени избыточно экспрессируются в тканях рака легких (НМРЛадено = немелкоклеточная карцинома легких - аденокарцинома; НМРЛплоск = плоскоклеточная немелкоклеточная карцинома легких; НМРЛдругие = немелкоклеточная карцинома легких других подвидов; МРЛ = мелкоклеточная карцинома легких) в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+). Фоновый уровень данного балла рассчитывали по измерениям следующих соответствующих нормальных тканей: жировая ткань, надпочечник, желчные протоки, клетки крови, кровеносные сосуды, костный мозг, головной мозг, хрящевая ткань, пищевод, глаз, желчный пузырь, сердце, голова и шея, почка, толстая кишка, печень, легкие, лимфатический узел, нерв, паразитовидная железа, поджелудочная железа, гипофиз, плевра, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, щитовидная железа, трахея, мочевого пузырь, мочеточник. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов.

Пример 3. Иммуногенность *in vitro* для пептидов, презентуемых МНС I класса.

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению заявители провели исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8⁺ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом, заявители могли показать иммуногенность для рестриктированных по HLA-A*02:01, HLA-A*24:02, HLA-A*01:01, HLA-A*03:01, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01 и HLA-B*44:02 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8⁺ Т-клетки-предшественники (табл. 10а и 10б).

Прайминг CD8+ Т-клеток *in vitro*.

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (рМНС) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8+ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-B*07, HLA-B*08:01 или HLA-B*44 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Германия) здоровых доноров (после подписания формы информированного согласия) из Университетской клиники г. Мангейм, Германия.

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

Получение микросфер, покрытых рМНС и антителами к CD28, стимуляции Т-клеток и считывание производили на хорошо исследованной системе *in vitro*, используя четыре различные молекулы рМНС для каждого цикла стимуляций и 8 различных молекул рМНС для каждого цикла считывания.

Очищенный костимуляторный IgG2a мыши к антителам человека CD28 Ab 9.3 (Jung et al., 1987) был химически биотинилирован с использованием сульфо-N-гидроксисукцинимидобiotина, как рекомендуется изготовителем (Perbio, Бонн, Германия). Использованные микросферы представляли собой полистирольные частицы размером 5,6 мкм, покрытые стрептавидином (Bangs Laboratories, Иллинойс, США).

рМНС, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A*02:01/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 532) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*02:01/DDX5-001 (YLLPAIVNI из DDX5, SEQ ID NO. 533), соответственно.

800 000 микросфер/200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии $4 \times 12,5$ нг другого биотинилированного комплекса рМНС, промывали и затем добавляли 600 нг биотинилированных антител к CD28 в объеме 200 мкл. Стимуляцию проводили в 96-луночных планшетах путем совместной инкубации 1×10^6 CD8+ Т-клеток с 2×10^5 промытых покрытых микросфер в 200 мкл среды ТСМ с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3 дней при 37°C. Половина среды была затем заменена на свежую среду ТСМ с добавлением 80 Ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с рМНС-мультимеров использовали 8 различных молекул рМНС на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012) с незначительными изменениями, относящимися к мечению с 5 различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия) и мультимерами рМНС с флуоресцентными метками. Для анализа использовали цитометр BD LSRII SORP, снабженный подходящими лазерами и фильтрами. Пептид-специфические клетки были подсчитаны как процентная доля от всех CD8+ клеток. Оценку результатов анализа мультимеров проводили с помощью программы FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Прайминг *in vitro* специфических мультимер-положительных CD8+ лимфоцитов оценивали сравнением со стимуляциями отрицательного контроля. Иммуногенность для заданного антигена была определена, если было обнаружено, что по меньшей мере в одной подлежащей оценке простимулированной *in vitro* лунке одного здорового донора содержалась специфическая CD8+ Т-клеточная линия после стимуляции *in vitro* (т.е. когда данная лунка содержала по меньшей мере 1% специфичных мультимер-положительных среди CD8-положительных Т-клеток и процентная доля специфичных мультимер-положительных клеток была по меньшей мере в 10 раз выше медианного значения стимуляций отрицательного контроля).

Иммуногенность *in vitro* для пептидов рака легких (в том числе НМРЛ и МРЛ) Для проанализированных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса, иммуногенность *in vitro* могла быть продемонстрирована генерированием пептид-специфических Т-клеточных линий. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимерами для 16 пептидов по изобретению показаны на фиг. 3-11 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 152 пептидов по изобретению обобщаются в табл. 10а и 10б.

Таблица 10а

Иммуногенность in vitro пептидов
HLA I класса по изобретению

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
491	KYLEKYYNL	++
492	NYEDHFPLL	++
493	TYKYVDINTF	+
494	RYLEKFYGL	+
495	SYNDALLTF	+++
496	VFMKDGFFYF	+
498	EYIRALQQL	+
500	VWSDVTPLTF	+
504	VYEKNGYIYF	++++
510	KVLEHVVRV	+
513	KLVELEHTL	+
515	KIFEMLEGV	+
516	YTFSGDVQL	+
519	KIQEILTQV	+
520	KIQEMQHFL	+
525	RLDDLKMTV	+
528	RLDSVSRL	+

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

Таблица 10б

Иммуногенность in vitro пептидов
HLA I класса по изобретению

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]	HLA
136	ATDLVVLDRY	"+"	A*01
143	FIDYPKKEDY	"+"	A*01
153	KLDRSVFTAY	"++++"	A*01
160	LTEAVLNRY	"++"	A*01
164	NTDNNLAVY	"+"	A*01
173	RTEFNLNQY	"++++"	A*01
174	SADDIRGIQSLY	"+"	A*01
185	TSDSNLNKY	"+"	A*01
187	VADLHLYLY	"+++"	A*01
189	VSDSECLSRV	"++"	A*01
193	VTEFSLNTY	"+"	A*01
201	YVGKEHMFY	"+"	A*01
395	ASEASRLAHY	"++"	A*01
398	ASEQQALHTVQY	"+"	A*01
405	ETEEGIYWRY	"+"	A*01
430	NTEGLHHLY	"+"	A*01
436	QTETGTPYMLY	"+"	A*01
451	YSDSLVQKGY	"+"	A*01
452	YVDAVLGKGHQY	"+"	A*01
84	YVDINTFRL	"+"	A*02

045010

85	YIDEFQSLV	"++"	A*02
87	TLYPYQISQL	"++"	A*02
88	VQMVITEAQKV	"++"	A*02
89	ILSTTMVTV	"+++"	A*02
93	TLQEKILQV	"+"	A*02
94	VLPDIETLIGV	"+++"	A*02
95	ITIGVLARV	"++++"	A*02
96	HLVGGLHTV	"+++"	A*02
97	VLALVNSTV	"+++"	A*02
101	FIISDWRFVL	"+"	A*02
125	VLQPFLPSI	"++++"	A*02
127	GLDGSLVFL	"++"	A*02
128	FLGTTPTL	"+"	A*02
129	VLYDKDAVYV	"++"	A*02
130	NLWGGQGLLGV	"+"	A*02
131	LLKEFVQRV	"++++"	A*02
132	ALWLVDPLTV	"+++"	A*02
133	MTLPVDAVISV	"+"	A*02
392	SLFKDQMEL	"+"	A*02
393	ILLPYLQTL	"+"	A*02
205	SLDGAARPK	"++"	A*03
208	GLASRILDAK	"+"	A*03
209	RTQIPMSEK	"+"	A*03
210	ATSGVPVYK	"++++"	A*03
214	RTMSEAALVRK	"+"	A*03
218	KTLVAELLILK	"+"	A*03
1	QYDPTPLTW	"+"	A*24
2	VWSNVTPLKF	"+"	A*24
4	SYEKVINYL	"+"	A*24
6	KYKDYFPVI	"+"	A*24
8	PFLPPAACFF	"+"	A*24
10	VWSDVTPLNF	"+"	A*24
11	YYSKSVGFMQW	"++"	A*24
13	HYTYILEVF	"+++"	A*24
15	KYALLLQDL	"+++"	A*24
16	TYNPDFSSL	"+"	A*24
59	KYSTTFFMV	"++"	A*24
60	TYLSIFDQL	"+"	A*24
61	NYAENITL	"++"	A*24
62	LYQEILAQL	"+"	A*24
65	VYPASKMFPI	"+"	A*24
66	IYFRDSSFL	"++"	A*24

045010

72	RYEGILYTI	"+"	A*24
76	WYGWHFPEL	"+"	A*24
79	RYLADLPTL	"+"	A*24
83	TYCQNIKEF	"+"	A*24
375	VYSDLHAFYY	"+"	A*24
379	NYIVPDKQIF	"+"	A*24
380	VFQEKHHVI	"+"	A*24
383	RYKQDVERF	"+++"	A*24
384	KYVKVFDKF	"+++"	A*24
386	VYNDHSIYVW	"++"	A*24
220	SPSVSQLSVL	"++++"	B*07
221	VPDVAQFVL	"++"	B*07
222	NPFYPEVEL	"+"	B*07
223	YPKDIYSSF	"++"	B*07
224	GPQPWHAAL	"++"	B*07
225	LPFDGPGGIL	"++++"	B*07
226	SPRMSGLLSQT	"+++"	B*07
228	YPRGNHWAVGHL	"++"	B*07
231	RPRALRDLQL	"++"	B*07
232	RPRALRDLQLL	"+++"	B*07
233	KPYQGNPTF	"+"	B*07
237	RPAATAVISL	"+"	B*07
241	SARLATDAL	"+++"	B*07
242	SPRWLPVSL	"++++"	B*07
244	FPYVRDFVM	"+"	B*07
245	RIREHVPQL	"++"	B*07
248	IPNWARQDL	"++++"	B*07
249	VPSSRILQL	"+++"	B*07
250	SPRDFLSGL	"+"	B*07
252	SPDIRNTTV	"+"	B*07
274	TPYQEHVAL	"+"	B*07
285	FPSFLTNSL	"++++"	B*07
292	SPQRLRGLLL	"+++"	B*07
293	RPRSALPRLLL	"++"	B*07
294	GPTPNTGAAL	"+++"	B*07
460	MPMAGDMNGL	"++"	B*07
462	RPFHTRATV	"++"	B*07
463	TPKAGPTL	"+"	B*07
473	LPRALLSSL	"++"	B*07
474	LPRLLPAL	"+++"	B*07
320	MEVDPIGHVYIF	"+"	B*44
322	KEVDPAGHSY	"++"	B*44

323	SEFMQVIF	"+"	B*44
325	QEQDVDLVQKY	"+"	B*44
326	QEMQHFLGL	"+"	B*44
328	FEYDFLLQRI	"+"	B*44
329	NEHPSNNW	"+"	B*44
330	KEGDLGGKQW	"+"	B*44
331	EDAQGHIW	"++"	B*44
333	AETLSTIQI	"+"	B*44
334	AEDEPAAHL	"+"	B*44
337	TENRYCVQL	"++"	B*44
338	SEGSEPALLHSW	"+"	B*44
339	SEPALLHSW	"++"	B*44
342	HEFSSPSHL	"+"	B*44
476	AEEEIMKKI	"+"	B*44
477	QENSYQSRL	"+"	B*44
297	RAQLKLVAL	"+"	B*08
298	FNKRKPLSL	"+"	B*08
299	MAQFKEISL	"++++"	B*08
300	VASPKHCVL	"+"	B*08
303	LPFPKFTV	"++"	B*08
305	ALKLRVAVL	"+"	B*08
306	ILKVKVGL	"+"	B*08
307	ILLPRTVSL	"+"	B*08
308	MLKQKVEEL	"+"	B*08
311	EIRRVVQM	"+"	B*08
312	EAMLRNKEL	"+"	B*08
313	ELKKKEYEEL	"+"	B*08
314	AIISRLVAL	"++"	B*08
315	DIYQRALNL	"+"	B*08
316	VIKEKALTL	"+"	B*08
318	EAAIRSVEL	"++"	B*08

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

Пример 4. Синтез пептидов.

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

Пример 5. Анализ связывания МНС.

Пептиды-кандидаты для Т-клеточной терапии в соответствии с настоящим изобретением далее были испытаны на их способность связываться с МНС (аффинность). Отдельные комплексы пептида и молекулы МНС были получены с помощью реакции обмена лигандами под воздействием УФ-излучения, при которой УФ-чувствительный пептид расщепляется под воздействием УФ-излучения, и получается продукт обмена с исследуемым пептидом. Только пептиды-кандидаты, которые могут эффективно связываться и стабилизировать восприимчивые к пептиду молекулы МНС, предотвращают диссоциацию комплексов с МНС. Для определения выхода продукта реакции обмена проводили анализ методом ELISA на основе обнаружения легкой цепи ($\beta 2m$) стабилизированных комплексов с МНС. Этот анализ производили, в основном, как описано у Rodenko и соавт. (Rodenko et al., 2006).

В 96-луночные планшеты MAXISorp (NUNC) на ночь вносили 2 мкг/мл стрептавидина в PBS при комнатной температуре, промывали 4 раза и блокировали в течение 1 ч при 37°C в блокирующем буфере с 2% БСА. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*02:01/MLA-001 служили в качестве стандарта, покрывающего диапазон 15-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-МНС после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл пероксидазы хрена, конъюгированной с антителом к $\beta 2m$, снова промывали и проводили обнаружение с помощью раствора ТМБ; реакцию останавливали NH_2SO_4 . Величину поглощения измеряли

при длине волны 450 нм. Пептиды-кандидаты, которые демонстрировали высокий выход реакции обмена (предпочтительно более 50%, наиболее предпочтительно, более 75%) обычно являются предпочтительными для генерирования и получения антител или их фрагментов и/или Т-клеточных рецепторов или их фрагментов, поскольку они проявляют достаточную avidность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

Таблица 11
Показатели связывания с молекулами МНС I класса

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
134	AAEIGDKSWLY	"++++"
135	ASEDSVLLY	"++++"
136	ATDLVVLDRY	"++++"
137	ATSKFMEFY	"++++"
138	DSDSCHFNLY	"++++"
139	ECDMAFHLY	"++++"
140	ESDREELNY	"+++"
141	ESDVGVVVY	"+++"
142	EVAEPSVLFDLY	"+++"
143	FIDYPKKEDY	"+++"
144	FLDSQNL SAY	"+++"
145	FVDKPVAY	"+++"
146	GLNTGSALSY	"++"
147	GSSDSSTLPKL	"++"
148	GTEFTTILY	"++++"
149	GTEFTTVLY	"++++"
150	GTELLSLVY	"++++"
151	HSDLKVG EY	"+++"
152	HTDSLHLLI	"+++"
153	KLDRSVFTAY	"+++"
154	LLDISQKNLY	"+++"
155	LLDPNPHMY	"++++"
156	LLDSLREQY	"+++"
157	LMDRPIFY	"++++"
158	LSDLLKQGY	"++++"
159	LSDTSVIQFY	"++++"
160	LTEAVLNRY	"+++"
161	LVDDGTHGQY	"+++"
162	LVDNSIRELQY	"+++"
163	NSDSSLTLREFY	"+++"
164	NTDNNLAVY	"++++"
165	NTDPTAPPY	"+++"
166	NTQITDIGRY	"+++"
167	QSDPGT SVLGY	"+++"

045010

168	QTDHPQPILDRY	"++++"
169	RLDTPLYFSY	"++++"
170	RSDDTAVYY	"++++"
171	RSDPVTNLVLY	"++++"
172	RTDSCSSAQAQY	"+++"
173	RTEFNLNQY	"++++"
174	SADDIRGIQSLY	"++++"
176	SRTINVSPLY	"+++"
177	SSDEVNFLVY	"++++"
178	SSDSSTLPKL	"++"
179	STAKSATWTY	"++++"
180	STDPWIQMAY	"++++"
181	TADGKTYYY	"+++"
182	TDYHVRVY	"+++"
183	TLEDIATSHLY	"++++"
184	TSAHPEDSSFY	"+++"
185	TSDSNLNKY	"++++"
186	TTDIEKY	"+++"
187	VADLHLYLY	"+++"
188	VSDAKLDKY	"+++"
189	VSDSECLSRVY	"++++"
190	VTGGINPLIDRY	"+++"
191	VTDGSLYEGVAY	"++++"
192	VTEESFDSKFY	"++++"
193	VTEFSLNTY	"++++"
194	VVADTKMIEY	"+"
195	VVDSVGGYLY	"++++"
196	WMFFVINY	"+"
197	YADTVRPEFY	"+++"
198	YLDPVQRDLY	"++++"
199	YLPQHTIETY	"++"
200	YSDEDVTKY	"++++"
201	YVGKEHMFY	"++++"
394	ASEAEMRLFY	"++++"
395	ASEASRLAHY	"++++"
396	ASEFGNHLYLY	"++++"
397	ASEITSKGASLY	"++++"
398	ASEQQALHTVQY	"++++"
399	ATDIPCLLY	"++++"
400	ATDISRQNEY	"+++"
401	DSDESYMEKSLY	"++++"
402	DTDSQRLAY	"+++"

045010

403	ELDSKVEVLTY	"+++"
404	ETARKFLYY	"++++"
405	ETEEGIWRY	"++++"
406	ETEQTKFWDY	"++++"
407	FSDNDKLYLY	"++++"
408	FTEQWTDGY	"+++"
409	FVDPLVTNY	"++++"
410	GSDHQSPSSSY	"++++"
411	GTVEYDLRY	"++++"
412	ILDEVIMGY	"++++"
413	ISDRYYTALY	"++++"
414	KTDESLTKY	"+++"
415	LLDPRSHTY	"+++"
416	LLDTAQKNLY	"++++"
417	LLEDKHFQSY	"++++"
418	LSDPSGPKSY	"+++"
419	LSELKPMSY	"++++"
420	LTEDKETLQY	"++++"
421	LTELLERAAFY	"++++"
422	MIDVTKSYY	"++++"
423	NLDAVHDITVAY	"++++"
424	NLDEEKQLLY	"+++"
425	NLDIIQVEY	"++++"
426	NLDQATRVAY	"+++"
427	NSDEQKITEMVY	"++++"
428	NSELSCQLY	"++++"
429	NTEDSSMSGYLY	"++++"
430	NTEGLHHLY	"++++"
431	NTSDMMGRMSY	"++++"
432	NVDPVQHTY	"+++"
433	QIDTGENLY	"++++"
434	QTDCAPNNGY	"++++"
435	QTDDTWRTEY	"++++"
436	QTETGTPYMLY	"++++"
437	STDGKHWWVEY	"++++"
438	STDNFNCKY	"+++"
439	TLDAGKFQIY	"+++"
440	TLDENPGVRY	"+++"
441	TLDSALNAASY	"++++"
442	TSDFSRFTNY	"++++"
443	TTDFPSESSFY	"++++"
444	TTDTVIRSY	"+++"
445	VLDQGKITEY	"+++"
446	VTAQVVGTERY	"++++"
447	VVDEHELIY	"+++"
448	YLDIPNPRY	"+++"
449	YLDRGTGNVSFY	"++++"
450	YSDDGQKWTVY	"++++"
451	YSDSLVQKGY	"++++"
452	YVDAVLGKGHQY	"++++"

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

Таблица 12
Показатели связывания с молекулами МНС I класса

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
84	YVDINTFRL	"++++"
85	YIDEFQSLV	"++++"
86	FVIDGFDEL	"++++"
87	TLYPYQISQL	"++++"
88	VQMVITEAQKV	"++++"
89	ILSTTMVTV	"++++"
91	FALPGLLHA	"+++"
92	NLRDLLSEV	"+++"
93	TLQEKILQV	"++++"
94	VLPDIE TLIGV	"++++"
95	ITIGVLARV	"++++"
96	HLVGG LHTV	"++++"
97	VLALVNSTV	"++++"
98	LQSSGLTLLL	"++++"
99	FLKEKVPGI	"++++"
100	RQYPTPFQL	"++++"
101	FIISDWRFVL	"+++"
102	SLLEQAIAL	"++++"
103	FLYYDPVVL	"++++"
104	GMLDIFWGV	"++++"
105	SLLTHIPTA	"++++"
106	FIIDTTYPAYV	"++++"
107	LLQGAIESV	"++++"
109	LLLSIGLLGV	"++++"
110	LLADFQALL	"++++"
111	ALCLLLHLL	"+"
112	SVSDGIHSV	"++++"
113	AVLTGLVEV	"++++"
114	ILDERQVLL	"++++"
115	MLLETQDALYV	"++++"
116	VLMEENSKL	"++++"
117	FLDPNARPLV	"++++"
118	ALSSVLHSI	"++++"
119	RTADITVTV	"++++"
120	ALLANLPAV	"++++"
121	ALVDTLTGI	"++++"
122	ALLEMFPEITV	"++++"
123	LMAFFLAVV	"++"
124	SVASVLLYL	"++++"
125	VLQPFLPSI	"++++"
126	FLSTVTSV	"++++"
127	GLDGSLVFL	"++++"
128	FLGTTPTL	"++++"
129	VLYDKDAVYV	"++++"
130	NLWGGQGLLGV	"++++"
131	LLKEFVQRV	"++++"
132	ALWLVDPLTV	"++++"
133	MPLPVDAVISV	"++++"
388	FSIPEGALVAV	"++++"
389	TLMEQPLTTL	"++++"
390	HIMPTVHTV	"++++"
391	SLIDMRGIETV	"++++"
392	SLFKDQMEL	"++++"
393	ILLPYLQTL	"++++"

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

Таблица 13
Показатели связывания с молекулами МНС I класса

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
202	KLAELEGALQK	"++++"
203	KVKDTPGLGK	"++++"
204	AVFDKFIRY	"++++"
205	SLDGAARPK	"++++"
206	KLIDLSQVMY	"++++"
207	RSFNGLLTMY	"++++"
208	GLASRILDAK	"++++"
209	RTQIPMSEK	"++++"
210	ATSGVPVYK	"++++"
211	TVNPVAIHK	"++++"
212	KAYEQVMHY	"++++"
214	RTMSEAALVRK	"++++"
215	MMFSGPQILKL	"++++"
216	KLYAWELAF	"+++"
217	RILNQILYY	"++++"
218	KTLVAELLILK	"+++"
219	RLRSSLVFK	"++++"
453	AINTSIKKNK	"++++"
454	KVYTPSISK	"++++"
455	RIADIFVKK	"++++"
456	SMFTAILKK	"++++"
457	SINKPTSER	"++++"
458	GIADFVLKY	"++++"

Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*03 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

Таблица 14
Показатели связывания с молекулами МНС I класса

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
1	QYDPTPLTW	"++++"
2	VWSNVTPLKF	"++++"
3	YLEKFYGL	"++"
4	SYEKVINYL	"++++"
5	RYMKKDYLI	"++++"
6	KYKDYFPVI	"++++"
7	VQQWSVAVF	"+++"
8	PFLPPAACFF	"++++"
10	VWSDVTPLNF	"++++"
11	YYSKSVGFMQW	"++++"
12	STIRGELFFF	"+"
13	HYTYILEVF	"++++"
14	SYSSCYSF	"+++"
15	KYALLLQDL	"++++"
16	TYNPDFSSL	"+++"
17	YYADKKTIVL	"+++"
18	DYIGSVEKW	"++++"
19	ILKEDPFLF	"+"
20	EFTTVLYNF	"++++"
21	SYEVRSTF	"+++"
22	TQPGDWTLF	"++++"
23	KFIISDWRF	"++++"

045010

24	MYPDLSELLM	"++++"
25	SYNGYVFYL	"++++"
26	KTPTNYLFL	"++++"
27	NYTLYPITF	"++++"
28	YYSIISHTL	"++++"
29	VYPLLSRLYW	"++++"
30	QYLPGWTVLF	"++++"
31	QYQNVLTWL	"++++"
32	SLPDLTPTF	"++++"
33	KSSVIASLLF	"+++"
34	MQPRMFFLF	"++++"
35	KYLEESWWL	"++++"
36	KQMEDGHTLF	"++"
37	QWPWQASLQF	"++++"
38	KYTNWKAFI	"++++"
39	LIFMLANVF	"+"
40	QYEPSAPSTTF	"+++"
42	TLPNTIYRF	"++++"
43	IQMDEPMAF	"+"
44	AYLSAVGTF	"++++"
45	KYFVPPQLF	"++++"
46	AFPVTSIFHTF	"++++"
47	KYADYFLEV	"++++"
48	VFIDHPVHLKF	"++++"
49	LYISEVRNI	"++++"
50	SYPELVKMWV	"++++"
51	KYALLLQEL	"++++"
52	KYMKIFHKF	"++++"
53	KYITNLEDL	"++++"
54	LLIKLLQTF	"+++"
55	RWMDQRLVF	"++++"
56	VYMIEPLEL	"++++"
57	YPSIIQEF	"++++"
58	QFAAPLRGIYF	"++++"
59	KYSTTFFMV	"++"
60	TYLSIFDQL	"+++"
61	NYAENILTL	"+++"
62	LYQEILAQL	"++++"
63	VMPSDSFFF	"++++"
64	NYAIFDEGHML	"++++"
65	VYPASKMFPFI	"++++"
66	IYFRDSSFL	"++++"

045010

67	RYPGKFYRV	"++++"
68	IYQIIQTY	"++++"
69	IMPEKFEFW	"++++"
70	PYTNYTFDF	"++++"
71	SYMVLAPVF	"++++"
72	RYEGILYTI	"++++"
73	SYIGLPLTL	"+++"
74	VYDQYFITL	"++++"
75	NYIYSISVF	"++++"
76	WYGWHFPEL	"+++"
77	AYTLGHEFV	"+"
78	TWFPKTPMLF	"++++"
79	RYLADLPTL	"++++"
80	YYSPLRDLL	"++++"
81	LYPEGLRLL	"++++"
82	RFLPSPVI	"++++"
83	TYCQNIKEF	"++++"
375	VYSDLHAFYY	"++++"
376	KYVKDFHKF	"++++"
377	VYVGAVNRI	"++++"
378	KFLGPAEHLTF	"++++"
379	NYIVPDKQIF	"+++"
380	VFQEKHHVI	"+++"
381	TYSKKHFRI	"++++"
382	IYSHHPTL	"+++"
383	RYKQDVERF	"+++"
384	KYVKVFDKF	"++++"
385	MYINEVERL	"++++"
386	VYNDHSIYVW	"++++"
387	RWLPQKNAAQF	"+++"

Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*24 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

Таблица 15

Показатели связывания с молекулами MHC I класса

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
220	SPSVSQLSVL	"++++"
221	VPDVAQFVL	"++++"
222	NPFYPEVEL	"+++"
223	YPKDIYSSF	"++++"
224	GPQPWHAAL	"++++"
225	LPFDGPGGIL	"++++"

045010

226	SPRMSGLLSQT	"++++"
227	YPRGNHWAVGH	"++++"
228	YPRGNHWAVGHL	"++++"
229	VPLPAGGGTV	"+++"
230	VPLPAGGGTVL	"+++"
231	RPRALRDLQL	"++++"
232	RPRALRDLQLL	"++++"
233	KPYQGNPTF	"++++"
234	RAKNAGVTI	"++++"
235	MPLKHYLLL	"++++"
236	RVRGGEDGDAL	"++++"
237	RPAATAVISL	"+++"
238	KPGPPWAAF	"++++"
239	YVPSASLFML	"++++"
240	SPREVTTVL	"++++"
241	SARLATDAL	"++++"
242	SPRWLPVSL	"++++"
243	RPIENRILIL	"++++"
244	FPYVRDFVM	"++++"
245	RIREHVPQL	"+++"
246	TPLPAVIVL	"++++"
247	RALLARLLL	"+++"
248	IPNWARQDL	"++++"
249	VPSSRILQL	"++++"
250	SPRDFLSGL	"++++"
251	VPRSSGQTV	"++++"
252	SPDIRNTTV	"++++"
253	RVIDAVRFTL	"+++"
254	NPFPHLITL	"++++"
255	MPLLENLYL	"++++"
256	SPRVPSIEL	"++++"
257	LPRIPFADV	"++++"
258	LPRGPLASL	"++++"
259	RPPAAGLRGISL	"++++"
260	YPQHPGLNA	"+++"
261	APSARVGVC	"+++"
262	SAYQRLEI	"+"
263	HPAPYGDLL	"++++"
265	SPRQPPRLV	"++++"
267	HPELVNHIVF	"++"
268	YPLFRGINL	"++++"
269	APRAPRLML	"++++"

045010

270	APGPRFLVT	"++++"
271	MPLPWSLALP	"++++"
272	MPLPWSLALPL	"++++"
273	MPLLWLRGF	"++"
274	TPYQEHVAL	"++++"
275	APHPPLSVV	"++++"
276	LPRAGGAFI	"++++"
278	HPMIDINGIIVF	"++"
279	SPARASPAL	"++++"
280	VPISEEGTPVL	"++++"
281	RPRAPVTPA	"++++"
282	MPQIETRVIL	"++++"
283	RPHLSSEL	"++++"
284	FPVTSIFHTF	"++"
285	FPSFLTNSL	"++++"
286	VPTLRSEL	"++++"
287	APREEQQRSL	"++++"
288	FPQKFIDLL	"++"
289	VPENHSVAL	"++++"
290	APYRPPDISL	"++++"
291	SPQRLRGLL	"++++"
292	SPQRLRGLLL	"++++"
293	RPRSALPRLLL	"++++"
294	GPTPNTGAAL	"++++"
295	KPEGTRIAV	"++++"
459	RPMQQARAQL	"++++"
460	MPMAGDMNGL	"++++"
462	RPFHTRATV	"++++"
463	TPKAGPTL	"++++"
464	YPRPGTPAA	"++++"
465	VPRPIFSQL	"++++"
466	APYKSVTSL	"++++"
467	KPFSSFTSM	"++++"
468	SPMYGQAGL	"++++"
469	YPENGVVQM	"++"
470	SPNSYFRVL	"++++"
471	KPRPDVTNEL	"++++"
472	NPRATDAQL	"++++"
473	LPRALLSSL	"++++"
474	LPRLPAL	"++++"
475	RPHKPGLYL	"++++"

Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA- B*07 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

Таблица 16

Показатели связывания с молекулами МНС I класса

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
296	MPMQDIKM	"++++"
297	RAQLKLVAL	"++++"
298	FNKRKPLSL	"+++"
299	MAQFKEISL	"++++"
300	VASPKHCVL	"+++"
301	YMHKLLVL	"++++"
302	HLLQKQTSI	"+++"
303	LPPFKFTV	"++++"
304	ELKKLYCQI	"++++"
305	ALKLRVAVL	"++++"
306	ILKVKVGL	"++++"
307	ILLPRTVSL	"++++"
308	MLKQKVEEL	"++++"
309	DAIQRKYSC	"+++"
310	LPPKQFVL	"++++"
311	EIRIRVQVM	"++++"
312	EAMLRNKEL	"++++"
313	ELKKKEYEEL	"++++"
314	AIISRLVAL	"++++"
315	DIYQRALNL	"++++"
316	VIKEKALT	"+++"
317	LVKVKVLL	"++++"
318	EAAIRSVEL	"++++"

Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-B*08 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

Таблица 17

Показатели связывания с молекулами МНС I класса

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
319	AEMLERVIKNY	"++++"
320	MEVDPIGHVYIF	"++++"
321	AEMLESVIKNY	"+++"
322	KEVDPAGHSY	"++"
323	SEFMQVIF	"+++"
324	TDSIHAWTF	"+++"
325	QEQVDLVQKY	"++"
326	QEMQHFLGL	"+++"
327	YEIEARNQVF	"+++"

045010

328	FEYDFLLQRI	"++++"
329	NEHPSNNW	"+++"
330	KEGDLGGKQW	"+++"
331	EDAQGHIW	"+++"
332	MEVPVIKI	"++"
333	AETLSTIQI	"+++"
334	AEDEPAAHL	"++"
335	KELEATKQY	"++"
336	ASSSGPMRWW	"++"
337	TENRYCVQL	"++++"
338	SEGSEPALLHSW	"+++"
339	SEPALLHSW	"+++"
340	TEFSLNTY	-
341	EEIEGKGSFTYF	"+++"
342	HEFSSPSHL	"+++"
343	TEFTTVLY	"++"
344	EEATGQFHVY	"+++"
345	IEFIHPQAF	"++++"
346	VEAPGPVHVYW	"++++"
347	ALNPYQYQY	"+++"
348	AEIQGNINHV	"+++"
349	AEQDMRELY	"+++"
350	GECDVFKEIL	"+++"
351	EEVNYINTF	"+++"
352	NEVLTYIKF	"++++"
353	GEIMQNNW	"++++"
354	TEDPTILRI	"+++"
355	SDMVRFHFLF	"++"
356	EEGRVYLF	"+++"
357	RELENCFQIQ	"+++"
358	KEADIHFLI	"++++"
359	DELFSIALLY	"++++"
360	AEVPTGVII	"+++"
361	SENLFFASF	"++++"
362	SEKGVIVVY	"+++"
363	AELDKLTSV	"+++"
364	AETPIQNVII	"+++"
365	SEMNVNMKY	"++++"
366	AENLFRF	"++"
367	GEVHPSEMI	"+++"
368	GEFPVRVQV	"++"
369	EEIERFFKL	"+++"

370	YEDLSQKY	"+"
371	GELALKKKI	"++"
372	TEGIIMKDF	"++"
373	MEMQKSPVF	"+++"
374	DEVNFLVY	"+"
476	AEEEIMKKI	"++"
477	QENSYQSRL	"+++"
478	SEIEQEIGSL	"+++"
479	AEIQPQTQV	"+++"
480	GEVSGLTKDF	"++"
481	RELQHEHSL	"+++"
482	TEREWADEW	"+++"
483	EENDQSTHKW	"+++"
484	AEVGFVRFF	"++++"
485	SEIEDSTKQVF	"+++"
486	SEDDPILQI	"+++"
487	AEDQLHHSF	"+++"
488	TEFPKMY	"++"
489	SEIGKAVGF	"++++"

Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-B*44 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++.

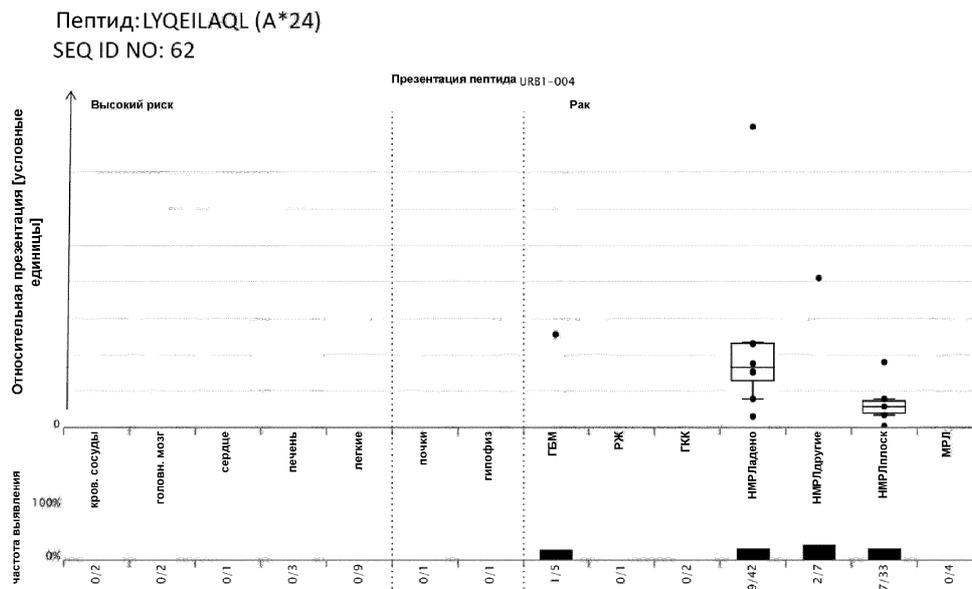
Список цитируемой литературы

- Allison, J. P. et al., *Science* **270** (1995): 932-933
 Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012): 891-902
 Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006): 1805-1814
 Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
 Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
 Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
 Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, **Vol.57** (1995): 289-300
 Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
 Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
 Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
 Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
 Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
 Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* **16** (2003a): 324-332
 Cohen, C. J. et al., *J Immunol* **170** (2003b): 4349-4361
 Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69** (1972): 2110-2114
 Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
 Colombetti, S. et al., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738
 Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
 Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003): 2197-2207

- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Follenzi, A. et al., *Nat Genet.* **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
- Gragert, L. et al., *Hum.Immunol.* **74** (2013): 1313-1320
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Gustafsson, C. et al., *Trends Biotechnol.* **22** (2004): 346-353
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* **rd** (2000)
- Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* **5** (2006): 471-484
- Kuball, J. et al., *Blood* **109** (2007): 2331-2338
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., *Nat.Genet.* **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* **3rd** (2004)
- Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* **7** (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- Rammensee, H. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* **140** (2015): 329-333
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* **1** (2006): 1120-1132
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011)
- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Schmitt, T. M. et al., *Hum.Gene Ther.* **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., *Clin Immunol.* **119** (2006): 135-145
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- SEER Stat facts, (2014), <http://seer.cancer.gov/>
- Shepherd, F. A. et al., *J Clin.Oncol.* **31** (2013): 2173-2181
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* **9** (2008): 163
- Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- Travis, W. D. et al., *J Clin.Oncol.* **31** (2013): 992-1001
- Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- World Cancer Report, (2014)
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- Zufferey, R. et al., *J Virol.* **73** (1999): 2886-2892

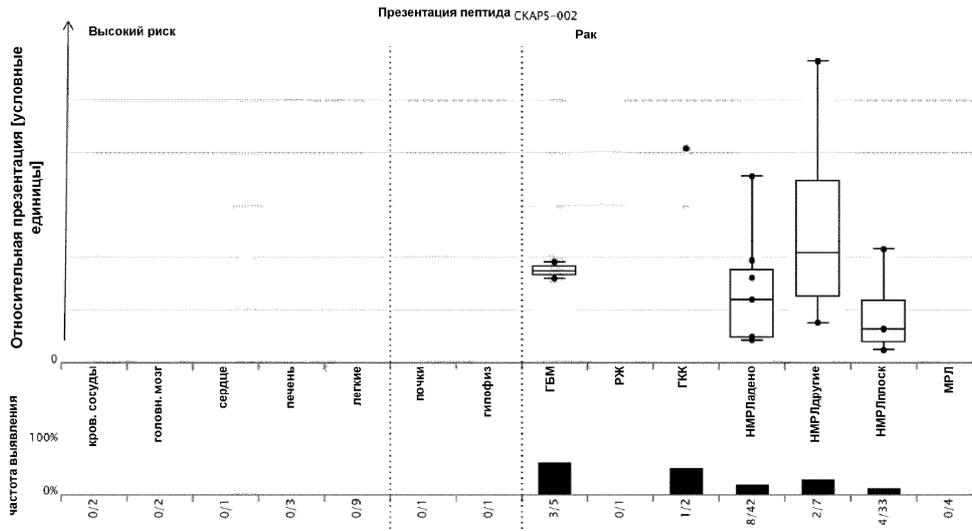
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, имеющий длину 10 аминокислот и состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 220, или его фармацевтически приемлемая соль.
2. Пептид по п.1, где указанный пептид имеет способность связываться с молекулой МНС I или II класса и где указанный пептид, когда он связан с указанной МНС, в состоянии распознаваться Т-клетками CD4 и/или CD8.
3. Слитый белок, содержащий пептид по любому из пп.1 и 2 и N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR.
4. Антитело или его фрагмент, которое специфически распознает пептид по любому из пп.1 и 2.
5. Т-клеточный рецептор или его фрагмент, который специфически реагирует с HLA-лигандом, причем указанный лиганд является пептидом по любому из пп.1 и 2.
6. Т-клеточный рецептор по п.5, где указанная аминокислотная последовательность лиганда содержит пептид в соответствии с любым из пп.1 и 2.
7. Т-клеточный рецептор по п.6, где указанный Т-клеточный рецептор представлен в виде растворимой молекулы.
8. Способ получения активированных Т-лимфоцитов *in vitro*, где способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, в течение периода времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом по любому из пп.1 и 2.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида по любому из пп.1 и 2, слитого белка по п.3, антитела или его фрагмента по п.4, Т-клеточного рецептора или его фрагмента по пп.5-7 или активированного Т-лимфоцита, полученного способом по п.8, и фармацевтически приемлемый носитель.
10. Применение пептида по любому из пп.1 и 2 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.
11. Применение антитела или его фрагмента по п.4 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.
12. Применение Т-клеточного рецептора или его фрагмента по пп.5-7 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.
13. Применение активированного Т-лимфоцита, полученного способом по п.8, для изготовления лекарственного средства для лечения рака.



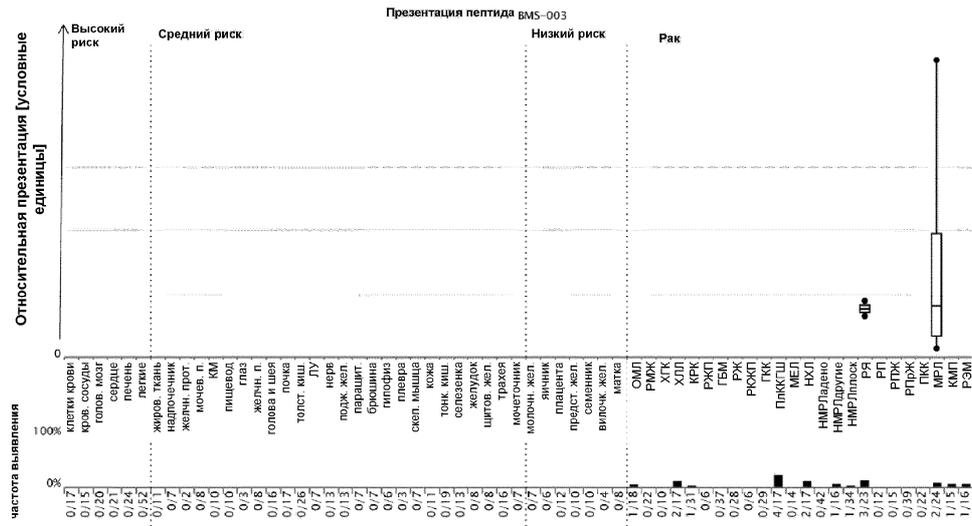
Фиг. 1А

Пептид: VYRASKMFPI (A*24)
SEQ ID NO: 65



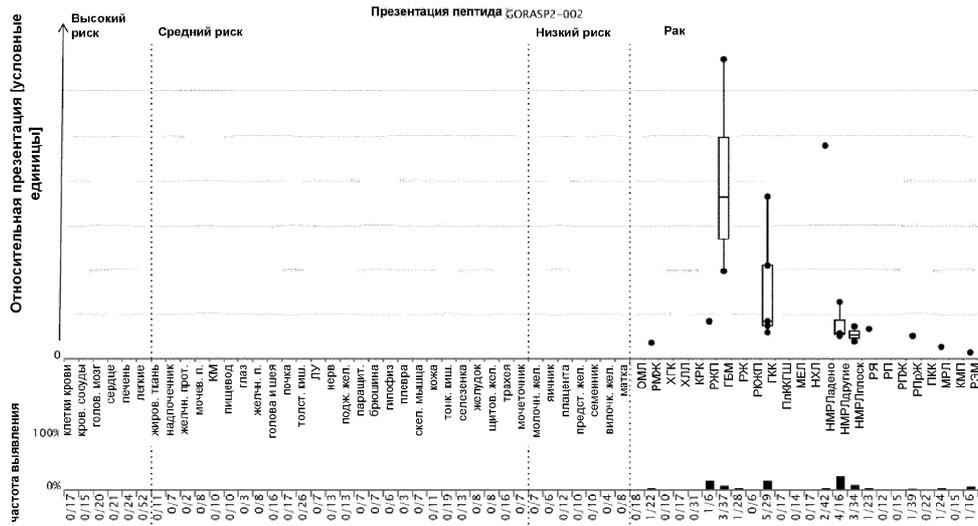
Фиг. 1В

Пептид: VLYDKDAVVV (A*02)
SEQ ID NO: 129



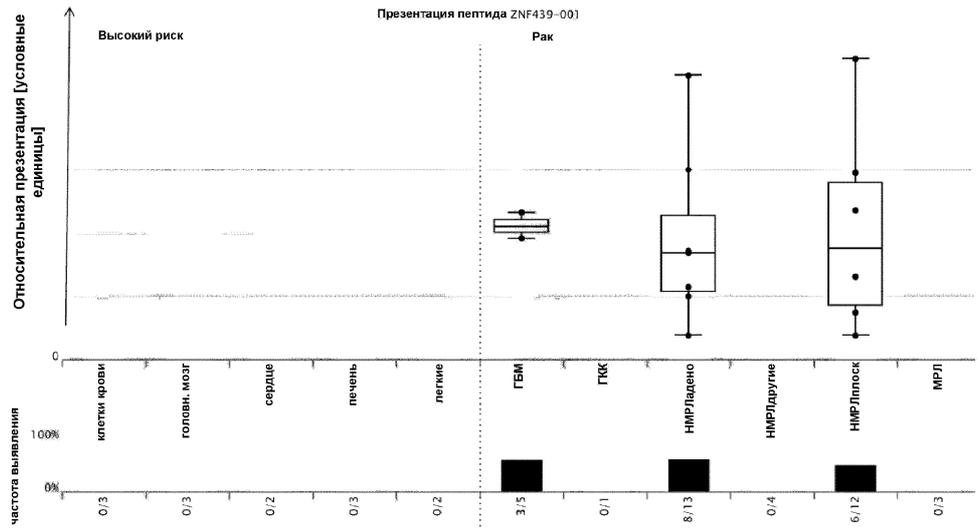
Фиг. 1С

Peptide: NLWGGQGLLV (A*02)
SEQ ID NO: 130



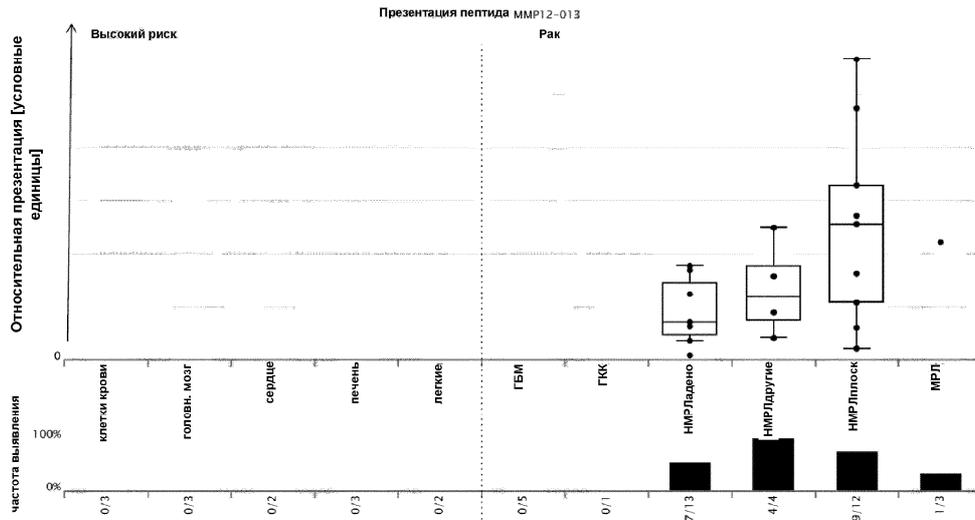
Фиг. 1D

Пептид: LLDISQKNLY (A*01)
SEQ ID NO: 154



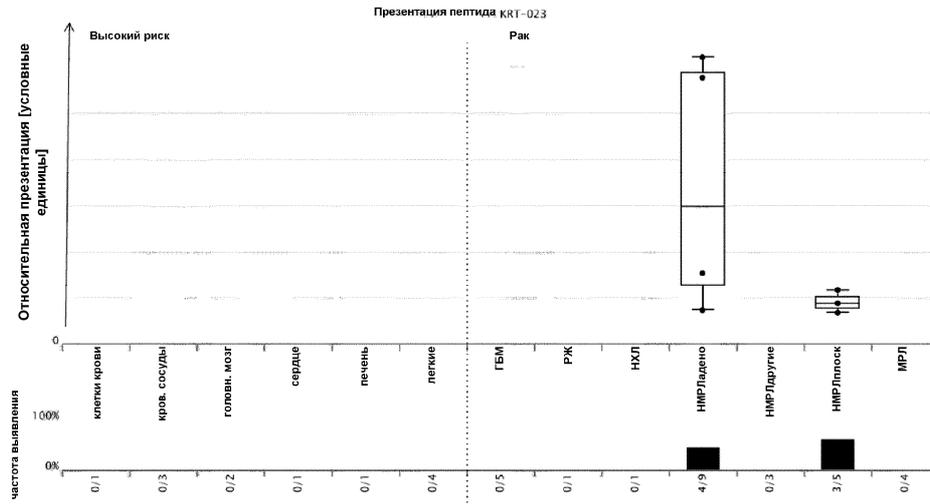
Фиг. 1E

Пептид: SADDIRGIQSLY (A*01)
SEQ ID NO: v174



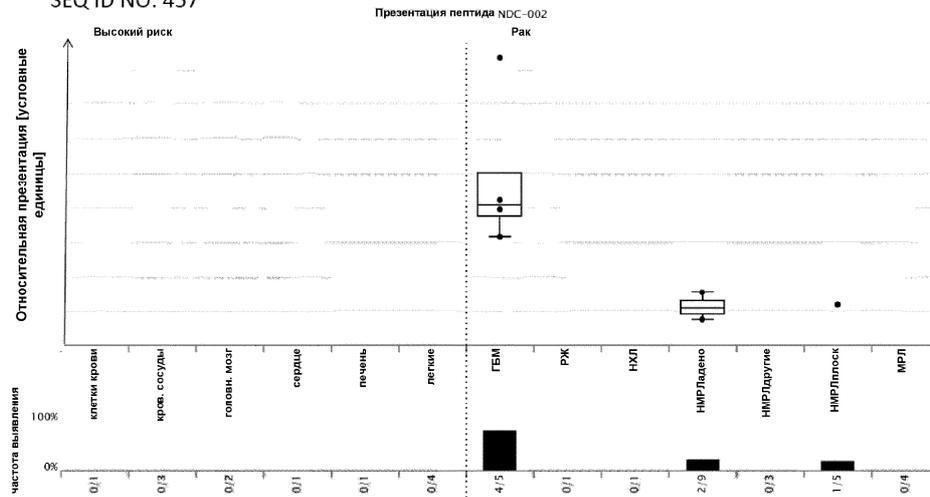
Фиг. 1F

Пептид: KLALEGALQK (A*03)
SEQ ID NO: 202



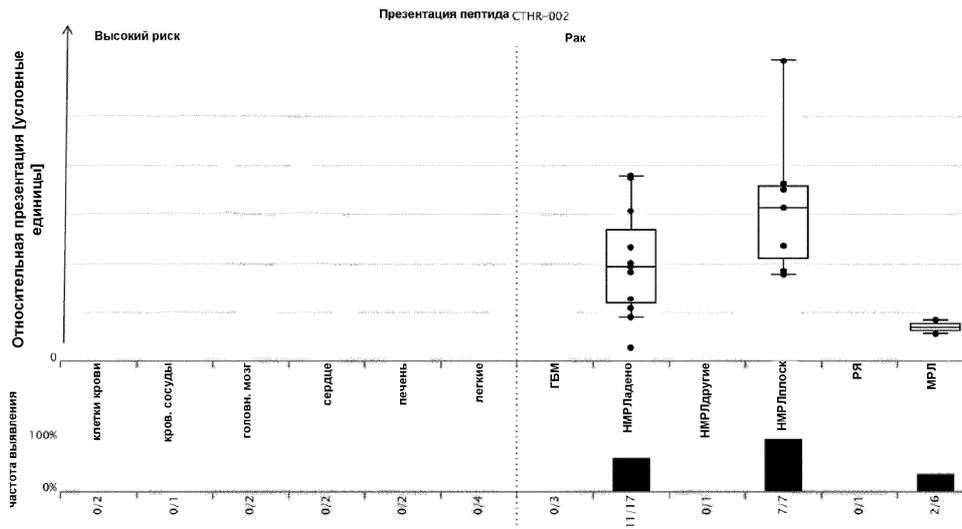
Фиг. 1G

Пептид: SINKPTSER (A*03)
SEQ ID NO: 457



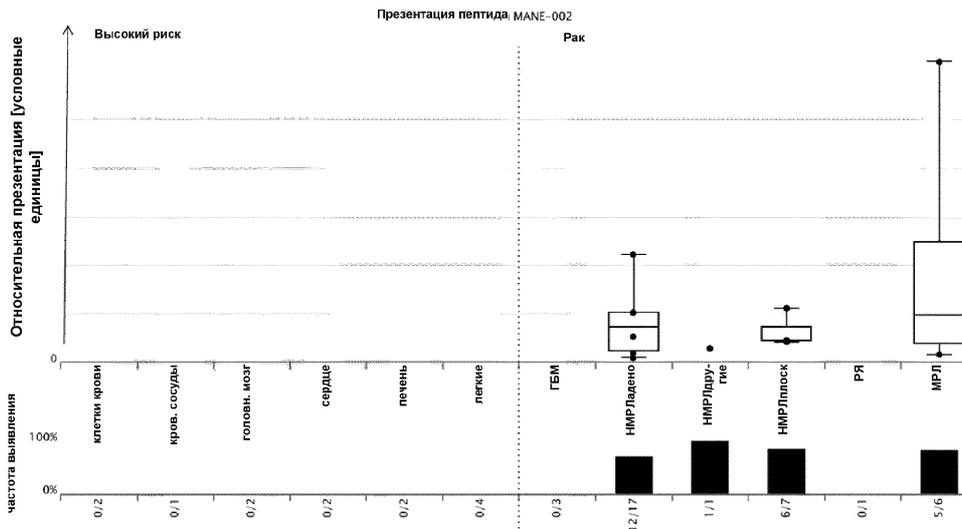
Фиг. 1H

Пептид: SPQRLRGLL (B*07)
SEQ ID NO: 297



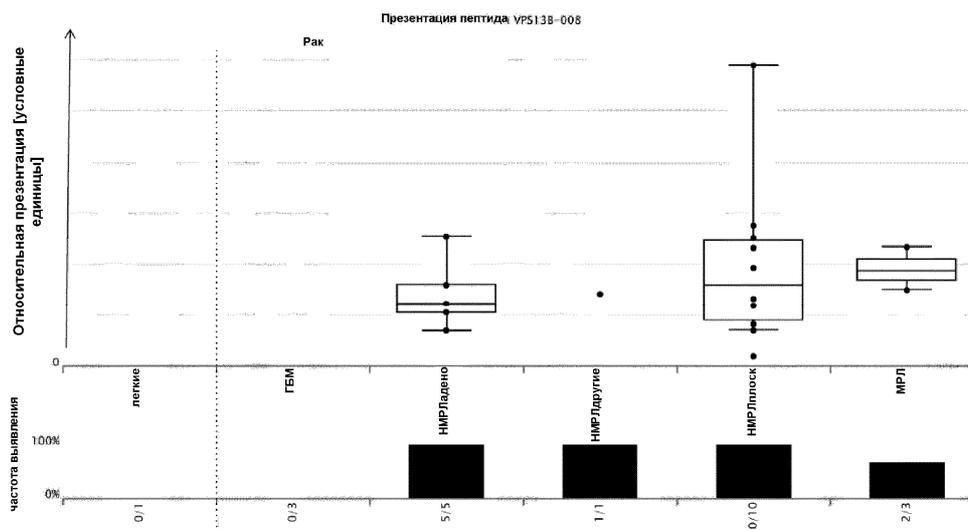
Фиг. 1I

Пептид: RPHKPGLYL (B*07)
SEQ ID NO: 475



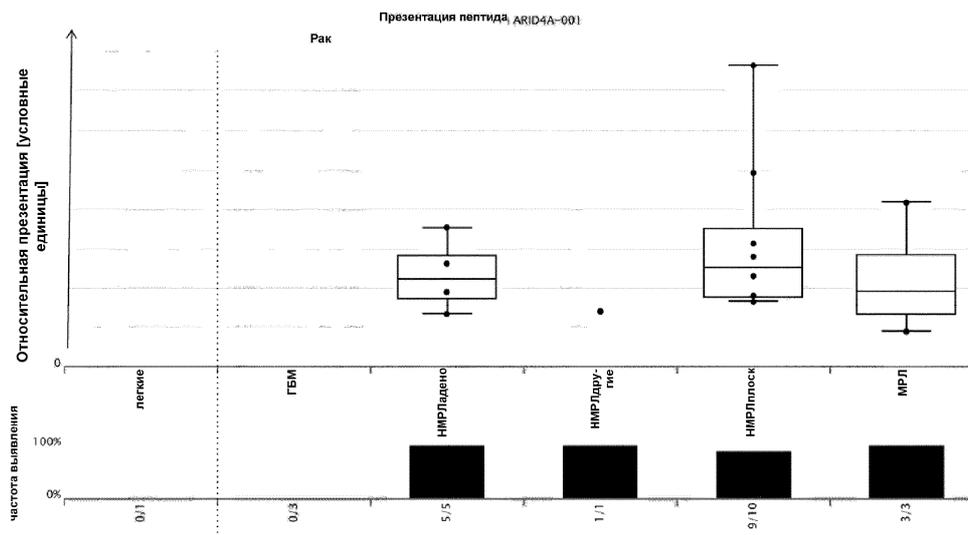
Фиг. 1J

Пептид: DIYQRALNL (B*08)
SEQ ID NO: 315



Фиг. 1К

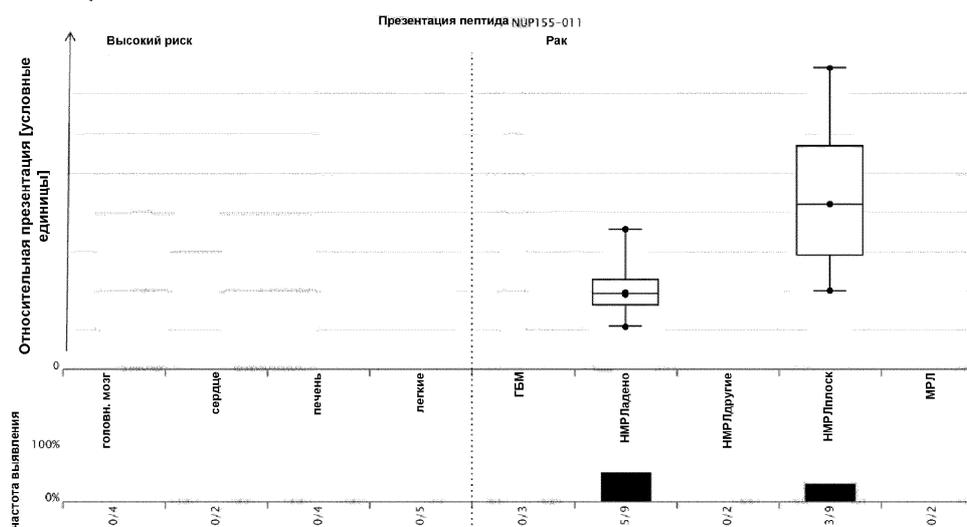
Пептид: LVKVKVLL (B*07)
SEQ ID NO: 317



Фиг. 1Л

Пептид: SEKGVIVQY (B*44)

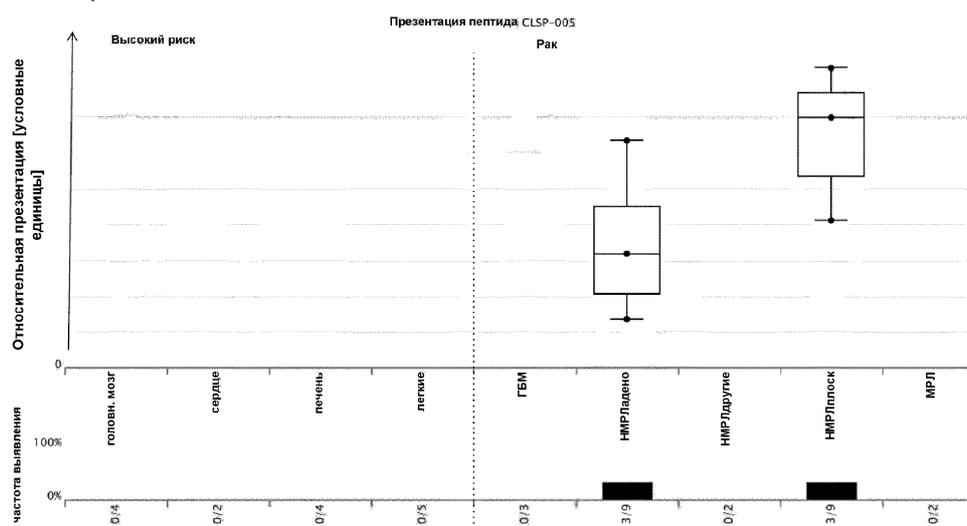
SEQ ID NO: 362



Фиг. 1M

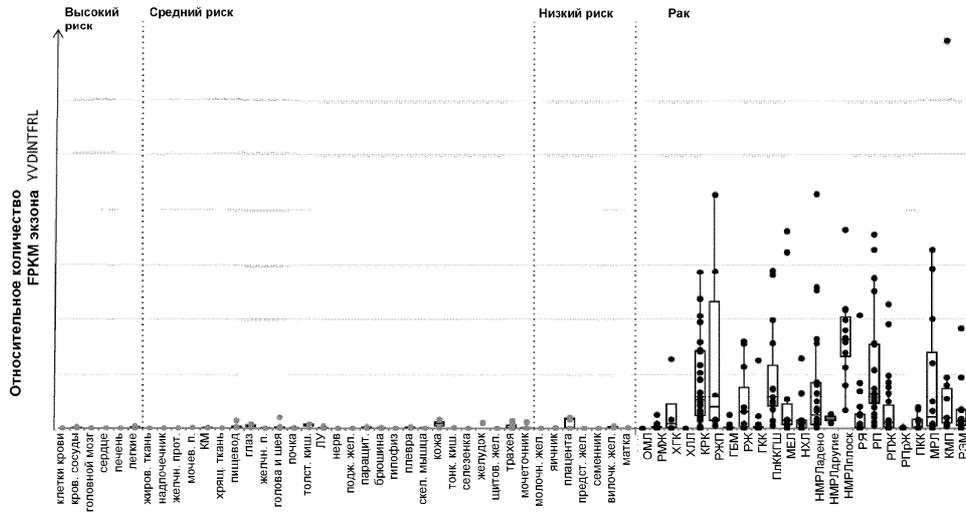
Пептид: SEIGKAVGF (B*44)

SEQ ID NO: 489



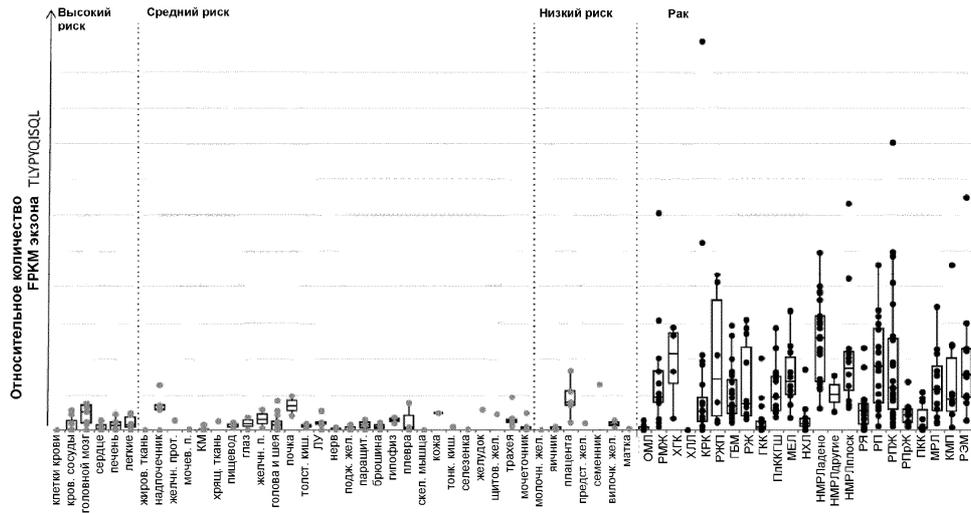
Фиг. 1N

Ген: MMP12
 Пептид: YVDINTFRL
 SEQ ID NO: 84



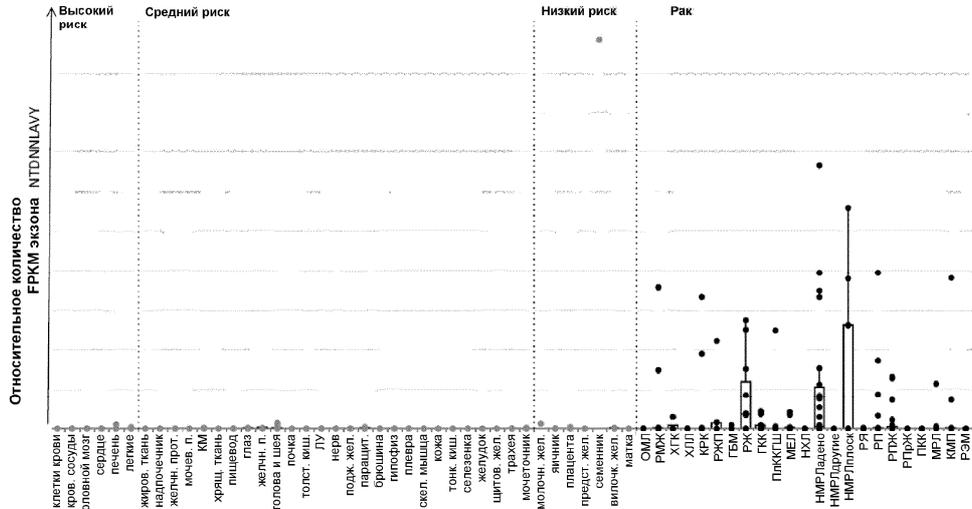
Фиг. 2С

Ген: KIF26B
 Пептид: TLYPYQISQL
 SEQ ID NO: 87



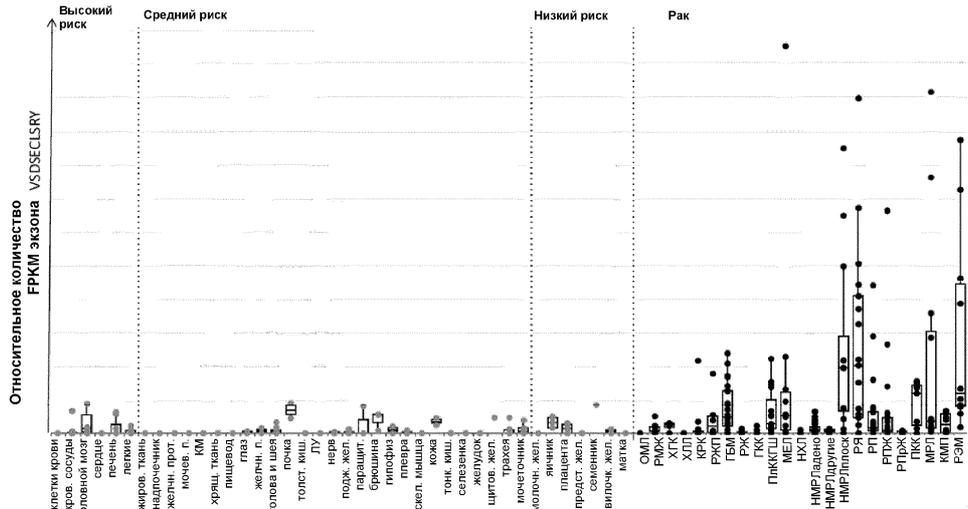
Фиг. 2D

Ген: CT83
 Пептид: NTDNNLAVY
 SEQ ID NO: 164



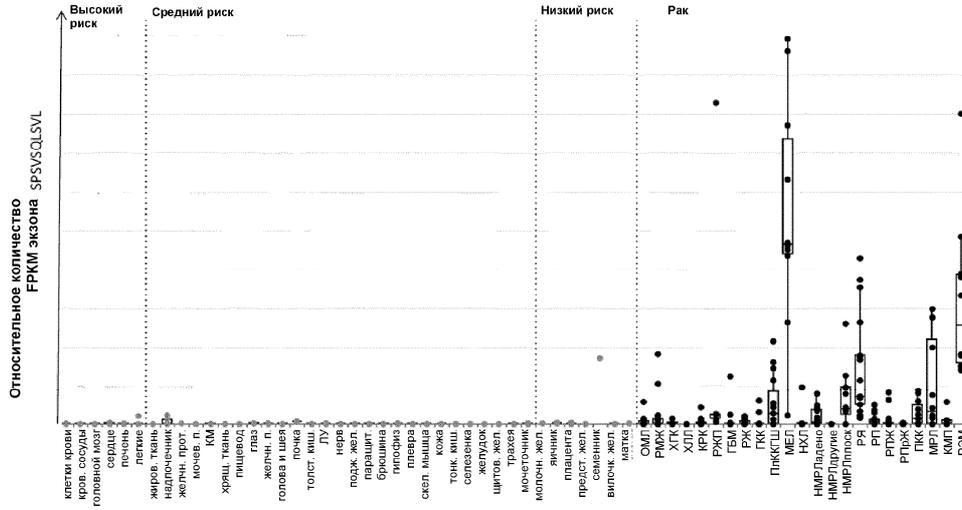
Фиг. 2Е

Ген: LAMA1
 Пептид: VSDSECLSRV
 SEQ ID NO: 189



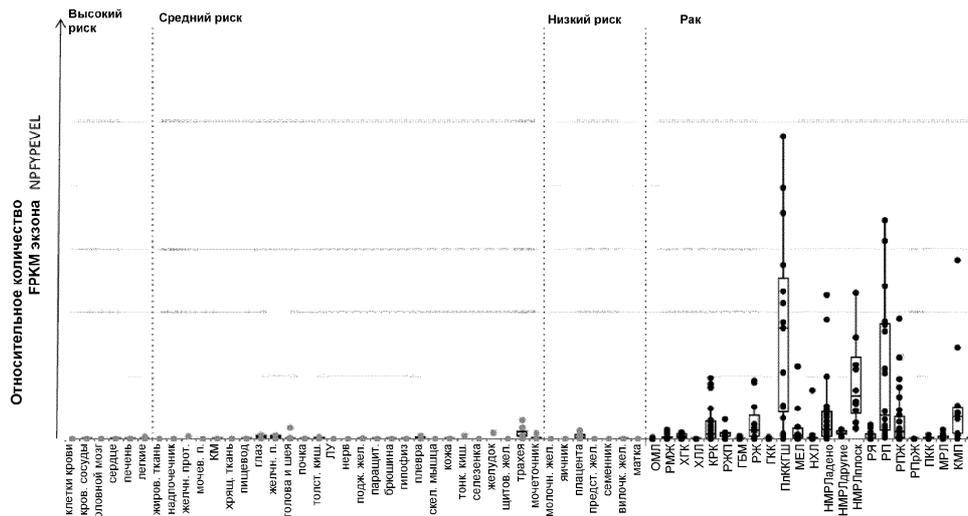
Фиг. 2F

Ген: PRAME
 Пептид: SPSVSQLSVL
 SEQ ID NO: 220

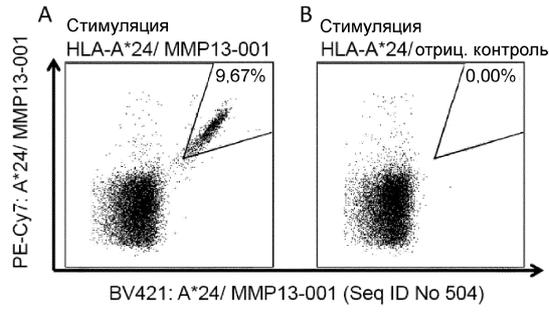


Фиг. 2I

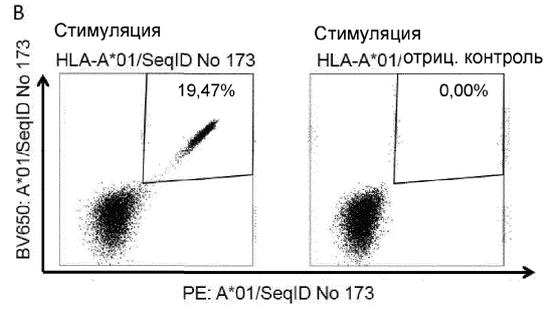
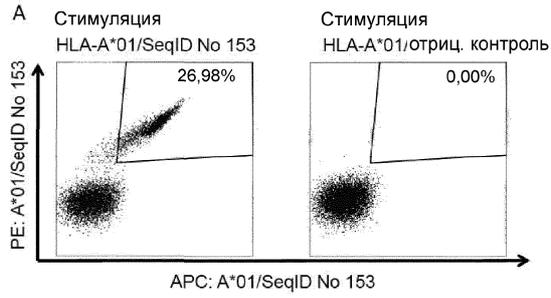
Ген: MMP1
 Пептид: NPFYREVEL
 SEQ ID NO: 222



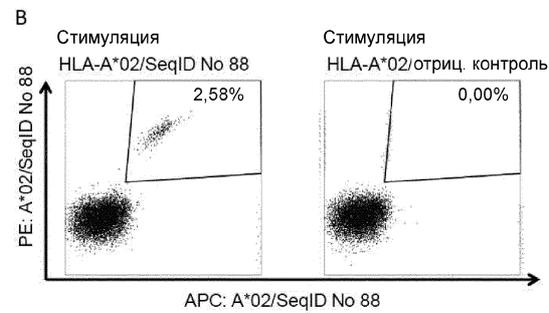
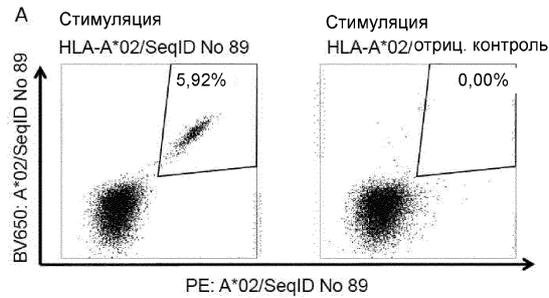
Фиг. 2J



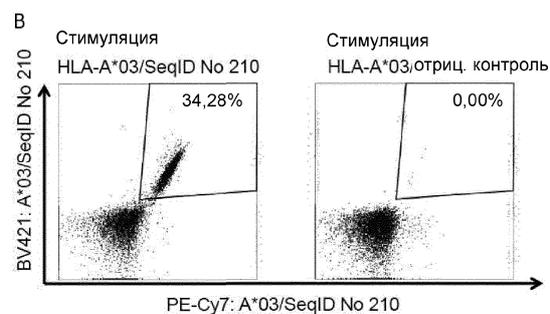
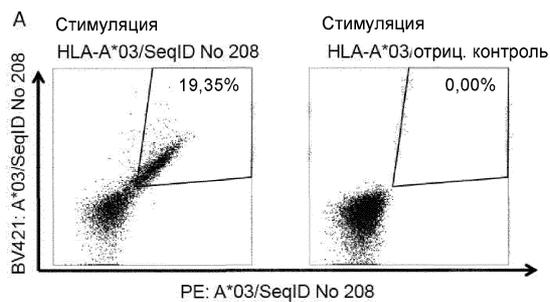
Фиг. 4



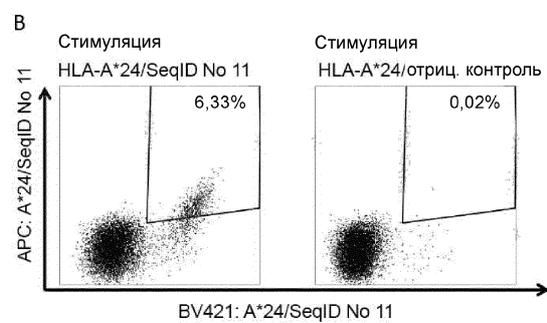
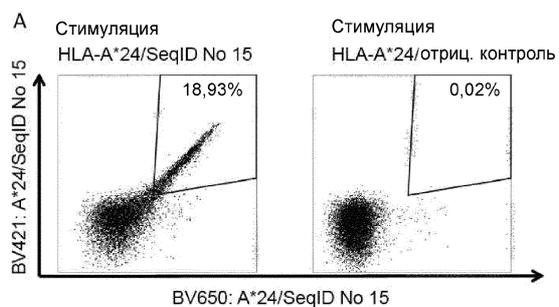
Фиг. 5



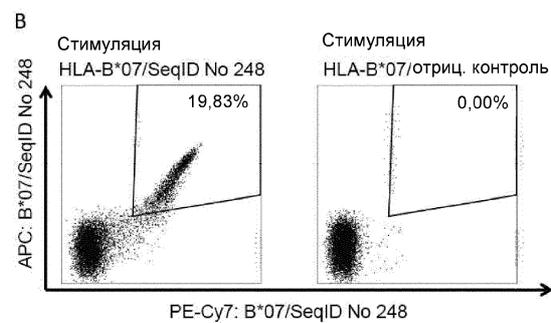
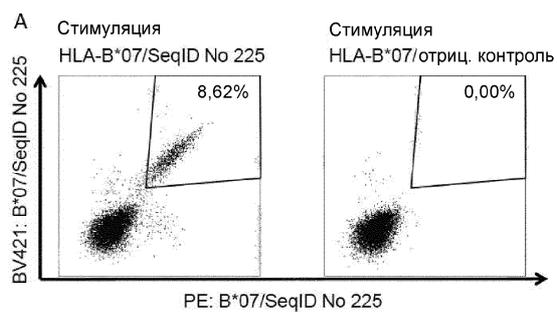
Фиг. 6



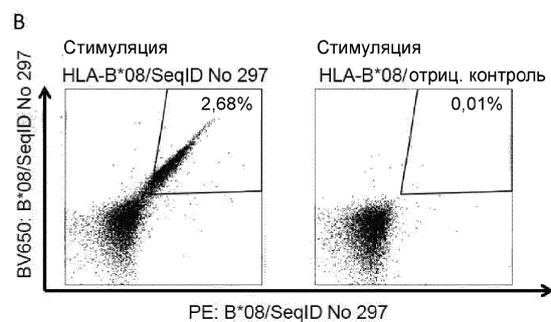
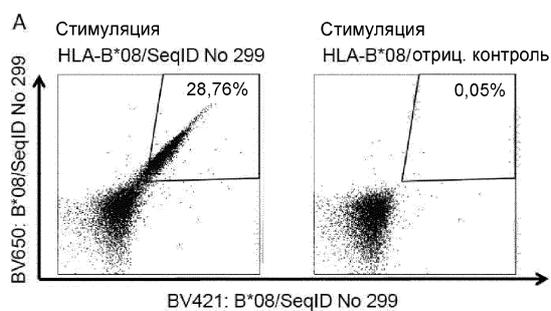
Фиг. 7



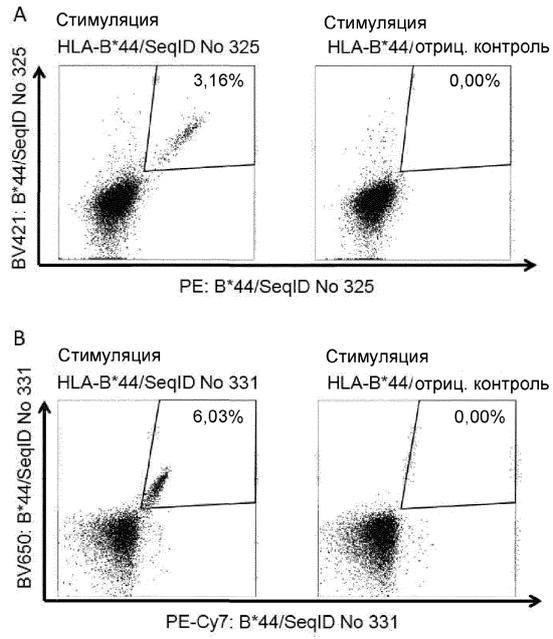
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

