

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393077** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.02.29**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.08.26**

(51) Int. Cl. *C07K 7/06* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*A61K 38/08* (2019.01)  
*A61K 39/385* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*A61K 35/00* (2006.01)

(54) **НОВЫЕ ПЕПТИДЫ, КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ И КАРКАСЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ  
В ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ МЕТОДЕ ЛЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАКА**

(31) **62/211,276; 1515321.6**

(32) **2015.08.28**

(33) **US; GB**

(62) **201891874; 2016.08.26**

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

(72) Изобретатель:

**Мар Андреа, Вайншенк Тони, Шоор  
Оливер, Фритше Йенс (DE), Сингх  
Харприт (US)**

(74) Представитель:

**Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Джермакян Р.В.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина Е.М.  
(RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к пептидам, белкам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится далее к 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.

**A2**

**202393077**

**202393077**

**A2**

## **НОВЫЕ ПЕПТИДЫ, КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ И КАРКАСЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ МЕТОДЕ ЛЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАКА**

Настоящее изобретение относится к пептидам, белкам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится далее к 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**

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2012 г. рак находился среди четырех основных неинфекционных смертельно опасных заболеваний в мире. По данным за тот же год колоректальный рак, рак молочной железы и раковые заболевания дыхательных путей находились в списке 10 наиболее распространенных причин смерти в странах с высоким уровнем доходов (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).

### Эпидемиология

Согласно оценкам, на 2012 г. приходится 14,1 миллиона новых случаев заболевания раком, 32,6 миллиона пациентов, страдающих раковыми заболеваниями (в течение 5 лет после постановки диагноза), и 8,2 миллиона случаев летального исхода от рака в мире (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

Внутри групп раковых заболеваний головного мозга, лейкоза и рака легких фокус настоящей заявки в частности направлен на глиобластому (ГБ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких (НМРЛ и МРЛ).

Рак легких является наиболее распространенным видом рака в мире и основной причиной смерти от рака во многих странах.

Рак молочной железы является иммуногенным видом рака, и различные виды инфильтрирующих иммунных клеток в первичных опухолях обладают определенной прогностической и предсказывающей значимостью. Было проведено множество клинических исследований ранних фаз в области иммунотерапии для пациентов с раком молочной железы. Целями большинства завершенных вакцинационных исследований были HER2 и углеводные антигены, как MUC-1, и их результаты неутешительны. Сейчас появляются клинические данные о воздействии модуляции иммунных контрольных точек с помощью ипилиумаба и других активирующих Т-клетки антител на пациентов с раком молочной железы (Emens, 2012).

#### *Хронический лимфоцитарный лейкоз*

В то время как ХЛЛ в настоящее время не поддается лечению, у многих пациентов наблюдаются лишь медленное прогрессирование заболевания или усиление симптомов. Поскольку пациенты не получают пользу от раннего начала лечения, первоначальный подход основан на принципе «наблюдай и жди» (Richards et al., 1999). Для пациентов с клиническими симптомами или быстро прогрессирующим заболеванием имеется несколько видов лечения. Они включают химиотерапию, таргетную терапию, терапию иммунными препаратами, как, например, моноклональные антитела, химерные антигенные рецепторы (CAR), и активную иммунотерапию, а также трансплантацию стволовых клеток.

Моноклональные антитела широко используются при лечении гематологических злокачественных заболеваний. Это связано с тем, что на основании хорошо охарактеризованных поверхностных молекул иммунных клеток и доступности опухолевых клеток в крови или костном мозге известны подходящие антигены. Мишенями широко используемых в лечении ХЛЛ моноклональных антител являются CD20 или CD52. Ритуксимаб, первое моноклональное ан-

титело к CD20, первоначально одобренное FDA для лечения НХЛ, сейчас широко используется в терапии ХЛЛ. Лечение комбинацией препаратов ритуксимаб/флударабин/циклофосфамид ведет к увеличению доли полных ответов (CR) и улучшало общую выживаемость (OS) по сравнению с комбинацией препаратов флударабин/циклофосфамид и стало предпочтительным вариантом лечения (Hallek et al., 2008). Мишенью офатумомаба является CD20, и он применяется в лечении пациентов с рефрактерным ХЛЛ (Wierda et al., 2011). Другим моноклональным антителом к CD20 является обинутузумаб, применяемый в терапии первой линии в комбинации с хлорамбуцилом (Goede et al., 2014).

Алемтузумаб – это антитело к CD52, применяемое для лечения пациентов с заболеваниями, резистентными к химиотерапии, или пациентов с неблагоприятными прогностическими факторами, такими как del(17p) или мутации p53 (Parikh et al., 2011).

Мишенями новых препаратов на основе моноклональных антител, проходящих сейчас доклинические испытания, являются CD37 (отлертузумаб, BI 836826, IMGN529 и (177)Лу-тетуломаб) или CD40 (дацетузумаб и лукатумумаб) (Robak and Robak, 2014).

Несколько завершенных и проводимых сейчас клинических исследований основаны на применении полученных методом генной инженерии аутологичных Т-клетках, измененных с помощью химерных антигенных рецепторов (CAR), со специфичностью к CD19 (Maus et al., 2014). До сих пор лишь у малой части пациентов были выявлены поддающиеся обнаружению или стабильно присутствующие рецепторы CAR. Один частичный ответ (PR) и два полных ответа (CR) были обнаружены в исследованиях Т-клеток CAR, проведенных Porter и соавт. и Kalos и соавт. (Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011).

Активная иммунотерапия включает следующие стратегии: генная терапия, вакцины на основе цельных модифицированных опухолевых клеток, вакцины на основе ДК и пептидов, полученных из опухолеассоциированных антигенов (ТАА).

В подходах генной терапии используются аутологичные генетически измененные опухолевые клетки. Такие клетки В-клеточного ХЛЛ трансфицируют иммуно-(ко-)стимулирующими генами, такими как ИЛ-2, ИЛ-12, TNF-альфа, GM-КСФ, CD80, CD40L, LFA-3 и ICAM-1, чтобы

улучшить презентацию антигена и активацию Т-клеток (Carballido et al., 2012). Тогда специфические Т-клеточные ответы и снижение количества опухолевых клеток можно легко наблюдать, иммунные ответы носят кратковременный характер.

В нескольких исследованиях в качестве антигенпрезентирующих клеток использовались аутологичные ДК, чтобы вызывать противоопухолевые ответы. ДК нагружали *ex vivo* опухолеассоциированными пептидами, лизатом цельных опухолевых клеток и полученной из опухоли РНК или ДНК. В другой стратегии цельные опухолевые клетки применяются для слияния с ДК и получения гибридных клеток ДК-В-ХЛЛ. Трансфицированные ДК инициировали как CD4+, так и CD8+ Т-клеточные ответы (Muller et al., 2004). Гибриды, полученные путем слияния, и ДК, нагруженные лизатом опухолевых клеток или апоптозными тельцами усиливали опухолеспецифические CD8+ Т-клеточные ответы. У пациентов, у которых наблюдался клинический ответ, повышается сывороточный уровень ИЛ-12 и снижается число регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs) (Palma et al., 2008).

В различных подходах используются модифицированные опухолевые клетки в целях инициации или усиления ХЛЛ-специфических иммунных ответов. Примером такой стратегии является получение клеток-триом: клетки В-ХЛЛ сливаются с клетками гибридомы, экспрессирующими антитела к Fc-рецептору и имеющими специфичность к анти-АПК. Клетки, полученные по триомной технологии, вызывали ХЛЛ-специфические ответы Т-клеток *in vitro* (Kronenberger et al., 2008).

В другой стратегии используется вакцина на основе облученных аутологичных клеток ХЛЛ с бациллой *Bacillus Calmette-Guérin* (БЦЖ) в качестве адьюванта. У нескольких пациентов наблюдалось снижение уровня лейкоцитов или стабильное заболевание (Hus et al., 2008).

Кроме выделенных из ХЛЛ клеток, цельную кровь пациентов с ХЛЛ использовали в качестве вакцины после ее обработки в отделении гематологии. Вакцина вызывала ХЛЛ-специфические ответы Т-клеток и приводила к частичным клиническим ответам или стабильному заболеванию у нескольких пациентов (Spaner et al., 2005).

Несколько ТАА избыточно экспрессируются клетками ХЛЛ и подходят для вакцин. Они включают фибромодулин (Maug et al., 2005), RHAMM/CD168 (Giannopoulos et al., 2006), MDM2

(Maury et al., 2006), hTERT (Counter et al., 1995), белок раково-эмбрионального антиген-незрелого рецептора ламинина (OFAiLRP) (Siegel et al., 2003), адипофилин (Schmidt et al., 2004), сурвивин (Granziero et al., 2001), KW1 - KW14 (Krackhardt et al., 2002) и полученный из опухоли участок IgVHCDR3 (Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012). Было проведено клиническое исследование фазы I с применением полученного из белка RHAMM пептида R3 в качестве вакцины. 5 из 6 пациентов имели поддающиеся обнаружению R3-специфические CD8+ Т-клеточные ответы (Giannopoulos et al., 2010).

### *Колоректальный рак*

В зависимости от стадии колоректального рака (КРК), для лечения рака толстой и прямой кишки имеются различные виды стандартной терапии. Стандартные процедуры включают хирургическую операцию, лучевую терапию, химиотерапию и таргетную терапию для КРК (Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b).

Кроме химиотерапевтических препаратов пациентам с заболеванием на поздних стадиях вводят несколько моноклональных антител, мишенями которых являются рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, цетуксимаб, панитумумаб) или сосудистый эндотелиальный фактор роста-А (VEGF-А, бевацизумаб). Для терапии второй и более поздних линий могут использоваться ингибитор VEGF афлиберцепт, ингибитор тирозинкиназы регорафениб и ингибитор тимидилатсинтазы TAS-102 и ингибитор дУТФазы TAS-114 (Stintzing, 2014; Wilson et al., 2014).

В самых последних клинических исследованиях в качестве варианта лечения КРК анализируется активная иммунотерапия. Ее стратегии включают вакцинацию пептидами из опухолеассоциированных антигенов (ТАА), цельными опухолевыми клетками, вакцинами на основе дендритных клеток (ДК) и вирусными векторами (Koido et al., 2013).

Пептидные вакцины до сих пор были направлены на раковоэмбриональный антиген (СЕА), муцин 1, EGFR, антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (SART3), человеческий хориогонадотропин-бета (бета-ХГЧ), антиген опухоли Уильмса 1 (WT1), сурвивин-2В, MAGE3, p53, белок с доменом ring finger 43 и транслоказу внешней митохондриальной мембраны 34 (ТОММ34) или имеющий мутации белок KRAS. В нескольких клинических исследованиях фазы I и II у пациентов наблюдались антиген-специфические ответы ЦТЛ или

выработка антител. В отличие от иммунологических ответов многие пациенты не получают пользы от пептидных вакцин на клиническом уровне (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

Вакцины на основе дендритных клеток (ДК) включают ДК, нагруженные полученными из ТАА пептидами, лизатами опухолевых клеток, апоптотическими опухолевыми клетками или опухолевой РНК или продуктами слияния ДК и опухолевых клеток. В то время как у многих пациентов во время исследований фазы I/II наблюдались специфические иммунные ответы, клиническую пользу получило лишь меньшинство пациентов (Koido et al., 2013).

Вакцины на основе цельных опухолевых клеток состоят из аутологичных опухолевых клеток, модифицированных таким образом, чтобы секретировать ГМ-КСФ. Модификация осуществляется под воздействием излучения или с помощью инфицированных вирусом облученных клеток. Большинство пациентов не получило клинической пользы в нескольких клинических исследованиях II/ III фазы (Koido et al., 2013).

Вирус коровьей оспы или птичий вирус оспы с дефектом репликации, кодирующий СЕА (раковоэмбриональный антиген), а также В7.1, ICAM-1 и LFA-3 использовали в качестве носителей в клинических исследованиях I фазы вакцин на основе вирусных векторов. В другом исследовании использовали нереплицируемый вирус оспы канареек, кодирующий СЕА и В7.1. Кроме индукции СЕА-специфических Т-клеточных ответов, 40% пациентов продемонстрировали объективные клинические ответы (Horig et al., 2000; Kaufman et al., 2008).

### *Рак пищевода*

Приоритетная стратегия лечения рака пищевода зависит от стадии опухоли и ее места расположения, гистологического типа и медицинского состояния пациента. Только хирургической операции недостаточно за исключением небольшой подгруппы пациентов с плоскоклеточной карциномой.

Имеются скудные данные о иммунотерапевтических подходах при лечении рака пищевода, поскольку было проведено лишь ограниченное количество клинических исследований ранней фазы. Вакцину, состоящую из трех пептидов, полученных из трех различных раково-тестику-

лярных антигенов (протеинкиназа ТТК, комплекс лимфоцитарного антигена 6 locus К и инсулиноподобный фактор роста-связывающий мРНК белок 3 (IGF)-II), вводили пациентам с распространенным раком пищевода в рамках клинического исследования фазы I с получением результатов умеренного характера. Введение внутрь опухоли активированных Т-клеток после их стимуляции *in vitro* аутологичными злокачественными клетками вызывало полные или частичные ответы опухоли у четырех из одиннадцати пациентов в исследовании I/II фазы (Тоomey et al., 2013).

#### *Рак желудка*

Рак желудка (РЖ) развивается в клетках, выстилающих слизистую оболочку, и распространяется во время роста во внешние слои. Операция является основным и единственным способом радикального лечения рака желудка. Применяемые сейчас схемы лечения распространенного РЖ малоэффективны, приводя к низкому уровню 5-летней выживаемости. Иммунотерапия могла бы стать альтернативным подходом в целях улучшения выживаемости пациентов с РЖ. Адоптивный перенос опухолеассоциированных лимфоцитов и цитокин-индуцированных киллерных клеток, вакцины на основе пептидов, мишенью которых являются HER2/neu, MAGE-3 или рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста 1 и 2, и вакцины на основе дендритных клеток, мишенью которых является HER2/neu, показали многообещающие результаты в рамках клинических исследований РЖ. Ингибирование иммунных контрольных точек и полученные методом генной инженерии Т-клетки могут стать дополнительными вариантами лечения, сейчас они проходят оценку в доклинических и клинических исследованиях (Matsueda and Graham, 2014).

#### *Глиобластома*

Существует крайне мало вариантов лечения глиобластомы (ВОЗ IV степени). Согласно руководству, опубликованному Германским обществом неврологии, стандартная терапия для молодых пациентов включает резекцию или биопсию опухоли, фокальную лучевую терапию и химиотерапию на основе темозоломида или CCNU/ломустина или прокарбазина в комбинации с CCNU и винкристином (PCV). В США, Канаде и Швейцарии применение бевацизумаба (антитело к VEGF) также одобрено для лечения рецидивов (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2014).

Было проведено исследование различных иммунотерапевтических подходов для лечения глиобластомы, включая ингибирования иммунных контрольных точек, вакцинацию и адоптивный перенос полученных методом генной инженерии Т-клеток.

Как было продемонстрировано, антитела к ингибиторным Т-клеточным рецепторам или их лигандам эффективно усиливают опосредованные Т-клетками иммунные ответы против опухоли при различных видах рака, включая меланому и рак мочевого пузыря. Воздействие антител, активирующих Т-клетки, таких как ипилимумаб и ниволумаб, проходит оценку в клинических исследованиях глиобластомы, однако предварительные данные указывают на побочные эффекты, связанные с аутоиммунными реакциями.

Сейчас проводятся исследования различных стратегий вакцинации для пациентов, больных глиобластомой, в том числе вакцин на основе пептидов, белков теплового шока, аутологичных вакцин на основе опухолевых клеток, дендритных клеток и вирусных белков. Чтобы вызвать противоопухолевый иммунный ответ у пациентов с глиобластомой в данных подходах используются пептиды, полученные из глиобластома-ассоциированных белков, таких как рецептор эпидермального фактора роста вариант III (EGFRvIII) или белков теплового шока или дендритных клеток, обработанных лизатом аутологичных опухолевых клеток или компонентами цитомегаловируса. Несколько из этих исследований обнаружили хорошие профили безопасности и переносимости, а также показали многообещающие результаты по эффективности.

Адоптивный перенос генетически измененных Т-клеток является дополнительным иммунотерапевтическим подходом к лечению глиобластомы. В настоящее время в различных клинических исследованиях производят оценку безопасности и эффективности Т-клеток, несущих химерный антигенный рецептор HER2, рецептора альфа 2 ИЛ-13 и EGFRvIII (Ampie et al., 2015).

### *Рак печени*

Лечение пациентов с заболеванием зависит от стадии опухоли в момент постановки диагноза и общего состояния печени. Если хирургическая операция не является возможным вариантом лечения, то в распоряжении имеются различные другие виды терапии.

В последнее время было проведено небольшое число клинических исследований применения иммунотерапии при лечении ГМК. Для активации субпопуляций иммунных клеток и(или) повышения иммуногенности опухоли использовали цитокины (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Другие клинические исследования были сфокусированы на инфузии опухоль-инфильтрующих лимфоцитов или активированных лимфоцитов периферической крови (Shi et al., 2004; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000b).

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

### *Меланома*

Стандартным способом лечения меланомы является полная хирургическая резекция вместе с окружающей здоровой тканью. Если резекция является неполной или вообще невозможна, то пациенты получают первичную лучевую терапию, которую можно комбинировать с введением интерферона-альфа на поздних стадиях заболевания (стадии IVB/C и IIIA-C).

Усиление иммунных ответов против опухоли, по-видимому, является многообещающей стратегией для лечения меланомы распространенной формы. В Соединенных Штатах ингибитор иммунной контрольной точки ипилимумаб, а также ингибиторы киназ BRAF, вемурафениб и дабрафениб, и ингибитор MEK, траметиниб, уже одобрены для лечения распространенной формы меланомы. Оба подхода усиливают противоопухолевый иммунитет пациента: ипилимумаб – непосредственно снижая ингибирование Т-клеток, а ингибиторы киназ – косвенно усиливая экспрессию меланоцитных дифференцирующих антигенов. Дополнительные ингибиторы контрольной точки (ниволумаб и ламбролизумаб) сейчас изучаются в клинических исследованиях, и получены первые обнадеживающие результаты. Кроме того, в клинических исследованиях изучаются различные комбинированные терапии, направленные на вызывание

противоопухолевых иммунных ответов. К ним относятся ипилимумаб в комбинации с ниволумабом, ипилимумаб в комбинации с полученной из gp100 пептидной вакциной, ипилимумаб в комбинации с дакарбазином, ипилимумаб в комбинации с ИЛ-2 и ипилимумаб в комбинации с ГМ-КСФ (Srivastava and McDermott, 2014).

Уже была проведена оценка нескольких различных подходов по вакцинации пациентов с распространенной меланомой. До сих пор клинические исследования фазы III дали скорее неутешительные результаты, и стратегии вакцинации, несомненно, необходимо улучшать. Поэтому новые клинические исследования, как, например, исследование ГМ-КСФ OncoVEX или исследование DERMA, направлены на улучшение клинической эффективности без снижения переносимости (<http://www.cancerresearchuk.org>).

Адоптивный перенос Т-клеток проявляет многообещающий потенциал для лечения меланомы поздних стадий. Культивированные *in vitro* аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты, а также Т-клетки, несущие Т-клеточный рецептор с высокой аффинностью к раково-тестикулярному антигену NY-ESO-1, оказывают существенное полезное воздействие и обладают низкой токсичностью при введении пациентам с меланомой. К сожалению, Т-клетки с Т-клеточными рецепторами с высокой аффинностью к меланоцит-специфическим антигенам MART1 и gp100 и к раково-тестикулярному антигену MAGEA3 в рамках клинических исследований вызывали значительные токсические эффекты. Таким образом, адоптивный перенос Т-клеток обладает высоким терапевтическим потенциалом, однако требуется дальнейшее повышение безопасности и переносимости данных способов лечения (Phan and Rosenberg, 2013; Hinrichs and Restifo, 2013).

#### *Немелкоклеточный рак легких*

Вид лечения определяется типом (мелкоклеточный или немелкоклеточный) и стадией ракового заболевания и включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, а также таргетную терапию биологическими препаратами, такими как бевацизумаб, эрлотиниб и гефитиниб.

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).

### *Рак яичника*

Хирургическая резекция является приоритетной терапией как на ранней, так и на поздней стадии карциномы яичника. После хирургического удаления проводят системную химиотерапию, основанную на аналогах платины, за исключением случаев рака яичника очень низкой степени злокачественности (стадия IA, степень злокачественности 1), для которых послеоперационная химиотерапия не показана.

Иммунотерапия, по-видимому, является многообещающей стратегией по усовершенствованию лечения пациентов с раком яичника, поскольку присутствие провоспалительных опухолеинфильтрующих лимфоцитов, в частности CD8-положительных Т-клеток, коррелирует с благоприятным прогнозом, и Т-клетки, специфичные к опухолиассоциированным антигенам могут быть выделены из раковой ткани.

В связи с этим проводится интенсивная научная работа по исследованию различных видов иммунотерапии рака яичника. Значительное число доклинических и клинических исследований уже было проведено, и дальнейшие исследования ведутся сейчас. Имеются клинические данные для терапии с применением цитокинов, вакцинации, лечения моноклональными антителами, адоптивного клеточного переноса и иммуномодуляции.

Цитокиновая терапия с применением интерлейкина-2, интерферона-альфа, интерферона-гамма или гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора направлена на усиление противоопухолевого иммунного ответа самого пациента, и эти виды лечения уже продемонстрировали обнадеживающие результаты в небольших когортах исследования.

Клинические исследования вакцинации I и II фазы с применением одного или нескольких пептидов, полученных из нескольких опухолеассоциированных белков (Her2/neu, NY-ESO-1, p53, белка опухоли Вильмса-1) или цельных опухолевых антигенов, полученных из аутологичных опухолевых клеток, продемонстрировали хорошие профили безопасности и переносимости, однако лишь низкую до умеренной клиническую эффективность.

Считается, что моноклональные антитела, которые специфически распознают опухолеассоциированные белки, усиливают уничтожение опухолевых клеток, опосредованное иммунными клетками. Антитела к СА-125 или эговомаб и абаговомаб, а также антитело к EpCAM, катумаксаб, продемонстрировали многообещающие результаты в клинических исследованиях II и III фаз. Однако антитело к MUC1, HMFG1, не смогло явно улучшить выживаемость на III фазе клинического исследования.

Для нацеливания на и блокировки фактора роста и рецепторов выживаемости на опухолевых клетках в альтернативном подходе применяются моноклональные антитела. Тогда как введение трастузумаба (антитело к HER2/neu) и MOv18 и MORAb-003 (антитела к рецептору фолиевой кислоты альфа) давало лишь ограниченную клиническую пользу пациентам с раком яичника, применение бевацизумаба (антитело к VEGF) в дополнение к стандартной химиотерапии при раке яичника поздних стадий, по-видимому, обладает преимуществами.

Адоптивный перенос иммунных клеток привел в неоднородным результатам в рамках клинических исследований. Адоптивный перенос аутологичных, культивированных *in vitro* опухолеинфильтрующих Т-клеток, как было показано в пилотном исследовании, является многообещающим подходом. Напротив, перенос Т-клеток с химерным антигенным рецептором, специфичным к рецептору фолиевой кислоты альфа, не приводил к значимому клиническому ответу в рамках исследования I фазы. Дендритные клетки, обработанные лизатом опухолевых клеток или опухолеассоциированными белками *in vitro*, как было показано, усиливают противоопухо-

левый Т-клеточный ответ при переносе, тем не менее степень активации Т-клеток не коррелировала с клинической эффективностью. В рамках исследования II фазы перенос естественных киллерных клеток вызывал значительные токсические эффекты.

Внутреннему противоопухолевому иммунитету, а также иммунотерапии препятствует иммуносупрессивное микроокружение опухоли. Чтобы преодолеть это препятствие, проводятся испытания иммуномоделирующих препаратов, таких как циклофосфамид, антитела к CD25 и пегилированный липосомальный доксорубин в комбинации с иммунотерапией. Наиболее достоверные данные имеются в настоящий момент для ипилимумаба, антитела к CTLA4, усиливающего активность Т-клеток. Ипилимумаб, как было показано, оказывает существенное противоопухолевое воздействие на пациентов с раком яичника (Mantia-Smaldone et al., 2012).

#### *Рак поджелудочной железы*

Существует крайне мало вариантов лечения пациентов с раком поджелудочной железы. Одной существенной проблемой для эффективности лечения обычно является поздняя стадия опухоли при постановке диагноза. Кроме того, рак поджелудочной железы достаточно резистентен к химиотерапевтическим препаратам, что может быть вызвано плотностью и гиповаскуляризацией десмопластической стромы опухоли.

Согласно руководству, опубликованному Германским обществом по борьбе с раком, Германским благотворительным фондом помощи онкологическим больным (Deutsche Krebshilfe e.V) и Федеральной медицинской ассоциацией Германии, резекция опухоли является единственным имеющимся вариантом радикального лечения.

Сейчас проводятся исследования вакцинационных стратегий в качестве дальнейшей инновационной и многообещающей альтернативы для лечения рака поджелудочной железы. Вакцины на основе пептидов, мишенью которых являются мутации KRAS, активная теломераза, гастрин, сурвивин, SEA и MUC1, уже прошли оценку в клинических исследованиях, показав отчасти многообещающие результаты. Кроме того, клинические исследования вакцин на основе дендритных клеток, аллогенных ГМ-КСФ-секретирующих вакцин и препарата альгенпантусель-L у пациентов с раком поджелудочной железы выявили положительное влияние иммунотерапии. Сейчас ведутся дополнительные клинические исследования, изучающие далее эффективность различных протоколов вакцинации (Salman et al., 2013).

### *Рак предстательной железы*

Стратегия лечения рака предстательной железы в основном зависит от стадии рака. Основанная на дендритных клетках вакцина «сипулейцел-Т» стала первой противораковой вакциной, одобренной Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA). В связи с положительным влиянием на выживаемость пациентов с КРРПЖ множество усилий прилагается для разработки дальнейших иммунотерапевтических методов. Что касается стратегий вакцинации, то многообещающие результаты в рамках различных клинических исследований показали пептидная вакцина на основе простат-специфического антигена (PSA)-TRICOM, персонализированная пептидная вакцина PPV, вакцина на основе ДНК рTVG-HP, вакцина на основе цельных клеток, экспрессирующих ГМ-КСФ, GVAX. Кроме того, вакцины на основе дендритных клеток, помимо сипулейцел-Т, а именно BPX-101 и DCVAC/Pa, как было показано, вызывают клинические ответы у пациентов с раком предстательной железы. Ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как ипилимумаб и ниволумаб, в настоящее время проходят оценку в рамках клинических исследований в качестве монотерапии, а также в комбинации с другими методами лечения, включая антиандрогенную терапию, местную лучевую терапию, PSA-TRICOM и GVAX. Исследования иммуномодулирующего средства тасквинимод, которое значительно уменьшало прогрессирование и повышало выживаемость без прогрессирования в рамках клинического исследования II фазы, сейчас продолжаются на III фазе. Леналидомид, другой иммуномодулятор, вызывал многообещающие эффекты в клинических исследованиях ранних фаз, однако не улучшил выживаемость на III фазе клинического исследования. Несмотря на эти неутешительные результаты, сейчас проводятся дальнейшие клинические испытания леналидомида (Quinn et al., 2015).

### *Почечно-клеточная карцинома*

Первичное лечение наиболее часто представляет собой частичное или полное удаление пораженной(ых) почки(почек) и остается основным элементом радикального лечения (Rini et al., 2008). Известная иммуногенность ПКК обуславливает применение иммунотерапии и противораковых вакцин при распространенной ПКК. Интересная корреляция между экспрессией лимфоцитов PD-1 и распространенной ПКК, степенью злокачественности и прогнозом течения, а также селективной экспрессией PD-L1 опухолевыми клетками ПКК и ее потенциальной ассоциацией с худшими клиническими исходами, привели к разработке новых средств на основе

антител к PD-1/PD-L1 в отдельности или в комбинации с антиангиогенными лекарственными средствами или другими иммунотерапевтическими подходами для лечения ПКК (Massari et al., 2015). Для ПКК поздних стадий в рамках клинического исследования противораковой вакцины III фазы TRIST проводится оценка того, продлевается ли выживаемость пациентов с ПКК локально-распространенной или метастатической стадии при лечении TroVax (вакциной с применением опухолеассоциированного антигена, 5T4, с поксвирусным вектором) в дополнение к стандартной терапии первой линии. Медиана выживаемости не была достигнута ни в одной из групп с 399 пациентами (54%), продолжающих исследование, тем не менее анализ данных подтверждает полученные ранее клинические результаты, демонстрируя, что вакцина TroVax является иммунологически активной, и что существует корреляция между интенсивностью ответа на 5T4-специфические антитела и улучшением выживаемости. Далее проводятся несколько исследований пептидных вакцин с применением эпитопов, избыточно экспрессируемых клетками ПКК.

Исследовались различные подходы по использованию противоопухолевых вакцин. Клинические исследования применения подходов на основе цельных опухолевых клеток, включая лизаты из опухолевых клеток, гибриды дендритных опухолевых клеток и цельных опухолевых РНК, были проведены для пациентов с ПКК. В некоторых из этих исследований сообщалось о ремиссии опухолевых очагов (Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001).

#### *Мелкоклеточный рак легких*

Лечение и прогнозирование МРЛ сильно зависит от стадии, на которой был поставлен диагноз. Иммунотерапия представляет собой широко исследованную область терапии рака. Большое количество подходов используются при лечении МРЛ. Целью одного из подходов – блокировка CTLA-4, супрессора естественного иммунитета человека. Ингибирование CTLA-4 направлено на стимулирование иммунной системы для борьбы с раком. Недавно была начата разработка многообещающих ингибиторов иммунных контрольных точек для лечения МРЛ. Другой подход основан на противораковых вакцинах и доступен сейчас для лечения МРЛ в рамках клинических исследований (American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute, 2015).

#### *Острый миелоидный лейкоз*

Один из вариантов лечения ОМЛ направлен на воздействие на CD33 с помощью препарата, конъюгированного с антителами (антитела к CD33 + калихеамицина, SGN-CD33a, антитела к CD33 + актиния-225), биспецифичных антител (распознавание CD33 + CD3 (AMG 330) или CD33 + CD16) и химерных антигенных рецепторов (CAR) (Estey, 2014).

#### *Неходжкинская лимфома (НХЛ)*

Лечение НХЛ зависит от гистологического типа и стадии заболевания (National Cancer Institute, 2015): У пациентов с лимфомой может наблюдаться спонтанная регрессия опухоли. Поэтому одним из вариантов лечения является активная иммунотерапия (Palomba, 2012).

Важный способ вакцинации включает идиотипические вакцины. В-лимфоциты экспрессируют поверхностные иммуноглобулины со специфической аминокислотной последовательностью на переменных участках их тяжелой и легкой цепей, уникальной для каждого клона клетки (= идиотип, Id). Идиотип выполняет функцию опухолеассоциированного антигена.

Пассивная иммунизация включает введение с помощью инъекции рекомбинантных мышинных моноклональных антител к Id в отдельности или в комбинации с IFNальфа, ИЛ-2 или хлорамбуцилом.

Активная иммунизация включает введение рекомбинантного белка (Id), конъюгированного с адьювантом (гемоцианин фиссуреллы, KLH), вводимого вместе с ГМ-КСФ в качестве иммуностимулятора. Опухолеспецифический идиотип получают на основе гибридных культур или при использовании рекомбинантных ДНК (плазмид) путем экспрессии в клеточных клетках бактерий, насекомых или млекопитающих.

Было проведено три клинических исследования III фазы (Biovest, Genitope, Favrille). В двух исследованиях пациенты получали ритуксимаб. ГМ-КСФ вводили во всех трех исследованиях. В исследовании Biovest использовали белок, полученный по гибридной технологии, в исследованиях Genitope и Favrille – рекомбинантный белок. Во всех трех исследованиях Id конъюгировали с гемоцианином фиссуреллы (KLH). Лишь исследование Biovest дало значимый результат.

Вакцины, отличные от Id, включают раково-тестикулярные антигены MAGE, NY-ESO1 и PARD-1, В-клеточный антиген CD20 или вакцины на основе клеток. Последнее из упомянутых состоит из ДК, обработанных апоптотическими опухолевыми клетками, лизатом из опухолевых клеток, гибридов ДК и опухолевых клеток или ДК, обработанных РНК, полученной из опухоли.

Вакцинация *in situ* включает вакцинацию внутритуморальными CpG в комбинации с химиотерапией или облученными опухолевыми клетками, выращенными в присутствии ГМ-КСФ и сбор/ инкубацию/ повторное введение Т-клеток.

В вакцинацию антителами, вносящими изменения в иммунологические контрольные точки, входят антитела к CD40, OX40, 41BB, CD27, GITR (антитело-агонисты, которые напрямую усиливают противоопухолевый ответ) или антитела к PD1, CTLA-4 (блокирующие антитела, которые ингибируют контрольную точку, которая препятствовала бы иммунному ответу). Примерами являются ипилимумаб (антитело к CTLA-4) и CT-011 (антитело к PD1) (Palomba, 2012).

#### *Рак матки*

Лечение эндометриодных карцином зависит от стадии заболевания. Большинство эндометриодных карцином включает эндометриодные аденокарциномы, от хорошо до умеренно дифференцированных форм, которые в момент постановки диагноза обычно ограничены телом матки и могут излечиваться с помощью гистерэктомии (World Cancer Report, 2014).

Также способ лечения рака шейки матки зависит от стадии заболевания. На ранних стадиях стандартом лечения является эксцизия, которая может комбинироваться с лучевой (химио-)терапией. Первичную лучевую (химио-)терапию выбирают для лечения на поздних стадиях (III стадия и выше), в случаях, когда поражены лимфатические узлы, или в тех случаях, когда опухоль невозможно удалить.

Также имеется несколько иммунотерапевтических подходов, которые сейчас проходят испытания. В рамках клинического исследования I/II фазы проводили вакцинацию пациентов, страдающих от рака матки, аутологичными дендритными клетками (ДК) с введенным с помощью электропорации мРНК гена опухоли Уильмса 1 (WT1). За исключением одного случая местной

аллергической реакции на адъювант, других неблагоприятных побочных реакций не наблюдалось, и у 3 из 6 пациентов наблюдался иммунологический ответ (Coosemans et al., 2013).

Как утверждалось выше, инфекция вируса человеческой папилломы (HPV) провоцирует очаги поражения, которые в конечном итоге могут привести к раку шейки матки. Таким образом, онкобелки вируса HPV, E6 и E7, которые конститутивно экспрессировались в очагах и раковых опухолях высокой степени злокачественности и необходимы для появления и сохранения злокачественного фенотипа, рассматриваются как многообещающие мишени в иммунотерапевтическом подходе (Hung et al., 2008; Vici et al., 2014). В рамках одного из клинических исследований лечение пациенток с метастатическим раком шейки матки проводили с помощью адоптивной Т-клеточной терапии (ACT). Пациентки получали инфузию из опухоль-инфильтрирующих Т-клеток (TILs), реагирующих с E6 и E7, что привело к полной регрессии у 2 и частичному ответу у 1 из 9 пациенток (Stevanovic et al., 2015). Более того, сообщалось, что внутриклеточные антитела, мишенью которых является E7, блокируют рост опухоли у мышей (Accardi et al., 2014). Также проводятся клинические исследования вакцин на основе пептидов, ДНК и ДК, мишенями которых являются E6 и E7 вируса HPV (Vici et al., 2014).

#### *Аденокарцинома и холангиокарцинома желчного пузыря*

Холангиокарцинома выявляется, в основном, на поздних стадиях, поскольку ее сложно диагностировать. Холангиокарцинома трудно поддается лечению и обычно приводит к летальному исходу.

Рак желчного пузыря является наиболее распространенным и агрессивным злокачественным заболеванием желчевыводящих путей в мире.

#### *Рак мочевого пузыря*

Стандарт лечения рака мочевого пузыря включает хирургическую операцию, лучевую терапию, химиотерапию и иммунотерапию.

Лечение рака мочевого пузыря на 0 и I стадиях обычно производится с помощью трансуретральной резекции, после которой потенциально возможно проведение внутривезикулярной химиотерапии, которая – в качестве варианта – может комбинироваться с внутривезикулярной БЦЖ-иммунотерапией (*bacillus Calmette-Guérin*).

Эффективный иммунотерапевтический подход зарекомендовал себя в лечении агрессивного немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИ РМП). По этому способу вводится ослабленная форма бактерий коровьей туберкулёзной палочки *Mycobacterium bovis* (*bacillus Calmette-Guérin* = БЦЖ) в виде раствора для внутрипузырного введения. Основным эффектом от лечения БЦЖ – это значительная долгосрочная защита (вплоть до 10 лет) от рецидивов заболевания и снижение скорости прогрессирования. В принципе, лечение БЦЖ вызывает местную воспалительную реакцию, которая стимулирует клеточный иммунный ответ. Иммунный ответ на БЦЖ основан на следующих ключевых этапах: инфицирование БЦЖ уротелиальных и раковых клеток мочевого пузыря, за которым следует повышенная экспрессия антигенпрезентирующих молекул, индукция иммунного ответа, опосредованного высвобождением цитокинов, индукция противоопухолевой активности за счет привлечения различных иммунных клеток (помимо прочих, цитотоксических Т-лимфоцитов, нейтрофилов, естественных киллерных клеток и макрофагов) (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013).

БЦЖ-терапия, как правило, хорошо переносится пациентами, однако может привести и к летальному исходу, в особенности в случае пациентов с иммунодефицитом. БЦЖ-рефрактерные опухоли наблюдаются у около 30-40% пациентов (Fuge et al., 2015; Steinberg et al., 2016a). Лечение пациентов, для которых БЦЖ-терапия оказалась неудачной, вызывает много трудностей. Для пациентов, БЦЖ-терапия для которых оказалась неудачной, существует высокий риск развития мышечно-инвазивного заболевания. Радикальная цистэктомия является предпочтительным вариантом лечения пациентов, не дающих ответ на терапию (Steinberg et al., 2016b; von Rundstedt and Lerner, 2015). Одобрённой FDA терапией второй линии для пациентов с НМИ РМП, БЦЖ-терапия для которых оказалась неэффективной, и которые хотели бы сохранить мочевой пузырь, является химиотерапия препаратом валрубицин. Ряд других видов терапии второй линии имеется в распоряжении или сейчас проходит исследование, среди них такие иммунотерапевтические подходы как виды комбинированной терапии на основе БЦЖ-интерферона или БЦЖ-ингибитора контрольной точки, чрескожная вакцинация рге-БЦЖ, лечение комплексами МСНА нуклеиновой кислоты из *Mycobacterium phlei* клеточной стенки, моно- или комбинированная химиотерапия различными препаратами, например, митомицином С, гемцитабином, доцетакселом, наб-паклитакселом, эпирубицином, митомицином/гемцитабином, гемцитабином/доцетакселом, и химиотерапевтические препараты, вводимые с по-

мощью аппаратов, например, термохимиотерапия, химиолучевая терапия, электрохимиотерапия или фотодинамическая терапия (Fuge et al., 2015; Steinberg et al., 2016b; von Rundstedt and Lerner, 2015). Все еще необходима дальнейшая оценка имеющихся видов терапии в клинических исследованиях.

Альтернативные виды лечения рака мочевого пузыря поздних стадий исследуются в проводимых сейчас клинических испытаниях. Актуальные клинические исследования сфокусированы на разработке молекулярно-таргетных видов терапии и иммунотерапии. В рамках таргетной терапии рака мочевого пузыря исследуется воздействие ингибиторов сигнального пути, связанного с онкогенезом (т. е. mTOR, рецепторов сосудистого эндотелиального, фибробластного или эпидермального фактора роста, ингибиторов анти-ангиогенеза или клеточного цикла). Разработка молекулярно-таргетных видов терапии по-прежнему связана со сложностями в связи с высокой степенью генетического многообразия рака мочевого пузыря. Основным направлением существующей иммунотерапии является разработка препаратов, блокирующих контрольные точки, например, моноклональных антител к PD1 и адаптивный перенос Т-клеток (Knollman et al., 2015b; Grivas et al., 2015; Jones et al., 2016; Rouanne et al., 2016).

#### *Плоскоклеточная карцинома головы и шеи*

Плоскоклеточные карциномы головы и шеи (ПлККГШ) – это гетерогенные опухоли с различиями в эпидемиологии, этиологии и способе лечения (Economopoulou et al., 2016).

ПлККГШ считается иммунодепрессивным заболеванием, характеризующимся нарушением регуляции иммунокомпетентных клеток и секреции цитокинов (Economopoulou et al., 2016). Иммунотерапевтические стратегии делают различие между HPV-отрицательными и HPV-положительными опухолями.

При HPV-положительных опухолях вирусные онкобелки E6 и E7 представляют собой хорошие мишени, поскольку они постоянно экспрессируются опухолевыми клетками и являются необходимыми для поддержания трансформационного статуса HPV-положительных раковых клеток. Сейчас ведется исследование нескольких видов терапии на основе вакцины для показания HPV-положительная ПлККГШ, включая вакцины на основе ДНК, пептидов и вакцины, включающие дендритные клетки (ДК). Кроме того, в проходящем сейчас клиническом исследовании II фазы изучается эффективность разрушения лимфоцитов с последующим введением

аутологичных инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ) пациентам с HPV-положительными опухолями (Economopoulou et al., 2016).

При HPV-отрицательных опухолях сейчас применяется и находится на исследовании несколько иммунотерапевтических стратегий. Химерное моноклональное антитело IgG1 к EGFR, цетуксимаб, было одобрено FDA в комбинации с химиотерапией в качестве стандартного лечения первой линии при рецидивирующей/метастатической ПлККГШ. Другие препараты на основе моноклональных антител к EGFR, включая панитумумаб, нимотузумаб и залутумумаб, проходят оценку для лечения ПлККГШ. Несколько ингибиторов иммунных контрольных точек проходят оценку в клинических исследованиях для их применения при ПлККГШ. Они включают следующие антитела: ипилимумаб (антитело к CTLA-4), тремелимумаб (антитело к CTLA-4), пембролизумаб (антитело к PD-1), ниволумаб (антитело к PD-1), дурвалумаб (антитело к PD-1), антитело к KIR, урелумаб (антитело к CD137) и антитело к LAG-3.

В двух клинических исследованиях с участием пациентов с ПлККГШ оценивали применение ДК, нагруженных пептидами p53 или апоптотическими опухолевыми клетками. Иммунологические ответы были удовлетворительными, а побочные эффекты – приемлемыми.

Было проведено несколько исследований с использованием адаптивной Т-клеточной терапии (АСТ). Т-клетки были простимулированы либо по отношению к облученным аутологичным опухолевым клетками, либо к EBV. Результаты относительно контроля заболевания и общей выживаемости были обнадеживающими (Economopoulou et al., 2016).

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 гепатоклеточной карциномы (ГКК), колоректальной карциномы (КРК), глиобластомы (ГБ), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), почечноклеточной карциномы (ПКК), доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПрЖ), рака предстательной железы (РПрЖ), рака яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), карциномы клеток Меркеля (ККМ), мелкоклеточного рака легких (НМРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП), рака матки

(РЭМ), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ), в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и упомянутых выше видов рака 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 сперматозоидах/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 экспрес-

сия 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  $\beta$ -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 эпитопов в опухолях, как в случае MUC1, или при таких событиях как белковый сплайсинг во время деградации, которые могут быть опухолеспецифическими или могут не быть ими.

е) Онковирусные белки: данные ТАА являются вирусными белками и могут играть ведущую роль в онкогенном процессе, и, так как они являются чужеродными (не человеческого происхождения), они могут провоцировать Т-клеточный ответ. Примерами таких белков являются вирусные белки вируса папилломы человека типа 16, E6 и E7, 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) (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 форма образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами.

Молекулы МНС I класса встречаются на большинстве клеток, имеющих ядро. Они презентруют 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 антиген-презентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются.

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

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

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

Удлиненные 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 ТН1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих комплексы опухолеассоциированный пептид / МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

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

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена иммунными клетками, то выделение пептидов II класса непосредственно из первичных опухолей ранее считалось невозможным. Тем не менее, Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 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 –ассоциированных антигенов, и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями. В предпочтительном варианте осуществления пептид должен избыточно презентироваться опухолевыми клетками по сравнению с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т. е. несколько копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с их функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени белков, напрямую являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве

и, таким образом, быть косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja et al., 2004). Необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, чтобы гарантировать, что такой пептид («иммуногенный пептид»), образованный из опухолеассоциированного антигена, ведет к Т-клеточному ответу *in vitro* или *in vivo*.

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

Поэтому антигены ТАА являются отправной точкой для разработки терапии на основе Т-клеток, включающей противоопухолевые вакцины, но не ограничивающейся ими. Методы идентификации и определения характеристики ТАА обычно основаны на использовании Т-клеток, которые могут быть выделены из организма пациентов или здоровых субъектов, или же они могут быть основаны на генерировании различающихся транскрипционных профилей или различающихся паттернов экспрессии пептидов между опухолевыми и нормальными тканями. Однако идентификация генов, избыточно экспрессированных в опухолевых тканях или человеческих опухолевых клеточных линиях или же селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не дает точной информации об использовании антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Это обусловлено тем, что только отдельная субпопуляция 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: 388, 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: 388, 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.

Тогда как наиболее важным критерием для пептида для выполнения функций мишени противораковой терапии является его избыточная презентация на первичных опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями, профиль экспрессии РНК соответствующего гена также может помочь выбрать подходящий пептиды. В частности, некоторые пептиды трудно поддаются обнаружению с помощью масс-спектрометрии как из-за их химических свойств, так и из-за малого числа их копий на клетках, и скрининговый подход, фокусирующийся на обнаружении презентации пептида, может оказаться безуспешным при идентификации этих мишеней. Тем не менее, эти мишени могут быть обнаружены альтернативным методом, в начале которого проводится анализ экспрессии генов в нормальных тканях, а затем оценка презентации пептидов и экспрессия генов в опухолях. Этот подход применялся в рамках настоящего изобретения с использованием банка данных мРНК (Lonsdale, 2013) в комбинации с дополнительной информацией по экспрессии генов (включая опухолевые образцы), а также данными о презентации пептидов. Если мРНК какого-либо гена практически отсутствует в нормальных тканях, в особенности в жизненно важных системах органов, использование в качестве мишеней соответствующих пептидов даже в высокоэффективных стратегиях (таких как биспецифические оптимизированные по аффинности антитела или Т-клеточные рецепторы), скорее всего, будет безопасным. Такие пептиды представляют собой интересные мишени, даже если они идентифицированы лишь на небольшом количестве (в процентном отношении) опухолевых тканей. Стандартный масс-спектрометрический анализ недостаточно чувствителен для оценки степени охвата мишеней на пептидном уровне. Вместо этого для оценки степени охвата может

быть использована экспрессия опухолевой мРНК. Для обнаружения самого пептида может быть необходим целенаправленный подход с таргетной масс-спектрометрией с более высокой чувствительностью, чем рутинный скрининг, и он может привести к более точной оценке охвата на уровне презентации пептидов.

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 388, 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 388, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8–100, предпочтительно 8–30 и, наиболее предпочтительно, 8–14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. Все пептиды Таблицы 1А и Таблицы 2А связываются с HLA-A\*02. Пептиды Таблицы 1В и Таблицы 2В связываются с HLA-A\*24. Пептиды Таблицы 1Б связываются с аллелями HLA II класса. Пептиды из Таблицы 3 являются дополнительными пептидами, связывающимися с молекулами HLA-A\*24, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению.

**Таблица 1А: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением, связывающиеся с молекулами HLA-A\*02.**

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
1	PLWGKVFYL	10926	DBF4
2	ALYGKLLKL	157680	VPS13B
3	TLLGKQVTL	157680	VPS13B
4	ELAEIVFKV	203427,349075,51373	SLC25A43, ZNF713, MRPS17
5	SLFGQEVYC	10840	ALDH1L1
6	FLDPAQRDL	57677	ZFP14
7	AAAQKVPEV	23382	AHCYL2
8	KLGPFLNA	100508781,653199,9747	FAM115B, FAM115A
9	FLGDYVENL	54832	VPS13C
10	KTLDFVNIIL	54832	VPS13C

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
11	GVLKVFLENV	121504,554313,8294,	HIST4H4, HIST2H4B,
12	GLIYEETRGV	8359,8360,8361,8362,	HIST1H4I, HIST1H4A,
13	VLRDNIQGI	8363,8364,8365,8366, 8367,8368,8370	HIST1H4D, HIST1H4F, HIST1H4K, HIST1H4J, HIST1H4C, HIST1H4H, HIST1H4B, HIST1H4E, HIST1H4L, HIST2H4A
14	LLDHLSFINKI	64863	METT4
15	ALGDYVHAC	4588	MUC6
16	HLYNNEEQV	101060798,1645,8644	AKR1C1, AKR1C3
17	ILHEHHIFL	4233	MET
18	YVLNEEDLQKV	4233	MET
19	TLLPTVLT	127707	KLHDC7A
20	ALDGHLIAI	127707	KLHDC7A
21	SLYHRVLLY	57221	KIAA1244
22	MLSDLTLQL	57221	KIAA1244
23	AQTVVVIKA	101059911,4586,7278 97	MUC5AC, MUC5B
24	FLWNGEDSAL	4586,727897	MUC5AC, MUC5B
25	IQADDFRTL	101059911,4586,7278 97	MUC5AC, MUC5B
26	KVDGVVIQL	101059911,4586,7278 97	MUC5AC, MUC5B
27	KVFGDLQV	169611	OLFML2A
28	TLYSMDLMKV	169611	OLFML2A
29	TLCNKTFTA	26137	ZBTB20
30	TVIDECTRI	26137	ZBTB20
31	ALSDETKNNWE V	5591	PRKDC
32	ILADEAFFSV	5591	PRKDC
33	LLLPLLPPLSPSL G	347252	IGFBPL1
34	LLPKKTESHHKT	8330,8331	HIST1H2AK, HIST1H2AJ
35	YVLPKLYVKL	100128168,10099674 7,441502,6231,64300 3,644166,644928,644 934,646753,728937,7 29188	RPS26P39, RPS26P11, RPS26, RPS26P28, RPS26P20, RPS26P15, RPS26P50, RPS26P2, RPS26P25, RPS26P58
36	KLYGIEIEV	56107	PCDHGA9
37	ALINDILGELVK L	85463	ZC3H12C
38	KMQEDLVTL	781	CACNA2D1
39	ALMAVVSGL	55103	RALGPS2

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
40	SLLALPQDLQA	1364,1365,23562,9074,9080	CLDN4, CLDN3, CLDN14, CLDN6, CLDN9
41	FVLPLVVTL	2848	GPR25
42	VLSPFILTL	113730	KLHDC7B
43	LLWAGPVTA	28603	TRBV6-4
44	GLLWQIIKV	5357	PLS1
45	VLGPTPELV	100124692	
46	SLAKHGIVAL	10693	CCT6B
47	GLYQAQVNL	89886	SLAMF9
48	TLDHKPVTV	203447	NRK
49	LLDESKLTL	64097	EPB41L4A
50	EYALLYHTL	26	ABP1
51	LLLDGDFTL	347051	SLC10A5
52	ELLSSIFFL	160418	TMTC3
53	SLLSHVIVA	545	ATR
54	FINPKGWNLL	3673	ITGA2
55	IASAIVNEL	57448	BIRC6
56	KILDLTRVL	79783	C7orf10
57	VLISSTVRL	166379	BBS12
58	ALDDSLTSL	2302	FOXJ1
59	ALTKILAEI	339766	MROH2A
60	FLIDTSASM	203522,26512	DDX26B, INTS6
61	HLPDFVKQL	9857	CEP350
62	SLFNQEVQI	100528032,22914,8302	KLRK1, KLRC4
63	TLSSERDFAL	100293534,720,721	C4A,C4B
64	GLSSSSYEL	89866	SEC16B
65	KLDGICWQV	733	C8G
66	FITDFYTTV	80055	PGAP1
67	GVIETVTSL	79895	ATP8B4
68	ALYGFFFKI	118663	BTBD16
69	GIYDGILHSI	158809,392433	MAGEB6, MAGEB6P1
70	GLFSQHFNL	1789	DNMT3B
71	GLITVDIAL	84162	KIAA1109
72	GMIGFQVLL	6006,6007	RHCE,RHD
73	GVPDTIATL	23120	ATP10B
74	ILDETLENV	167227	DCP2
75	ILDNVKNLL	4602	MYB
76	ILLDESNNHFL	222584	FAM83B
77	IVLSTIASV	10559,154313	SLC35A1, C6orf165
78	LLWGHPRVA	25878	MXRA5

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
79	SLVPLQILL	101060288,101060295,101060308,343068,343070,400735,440560,440561,441873,645359,653619,729368	PRAMEF5, PRAMEF9, PRAMEF4, PRAMEF11, PRAMEF6, PRAMEF15, PRAMEF23
80	TLDEYLTYL	101060308,343068,343070,653619	PRAMEF5, PRAMEF9, PRAMEF15
81	VLFLGKLLV	204962	SLC44A5
82	VLLRVLIL	102	ADAM10
83	ELLEYPQL	5288	PIK3C2G
84	FLEEEITRV	6570	SLC18A1
85	STLDGSLHAV	2081	ERN1
86	LLVTSLVVV	118471,118472	PRAP1, ZNF511
87	YLTEVFLHVV	55024	BANK1
88	ILLNTEDLASL	388015	RTL1
89	YLVAHNLLL	9365	KL
90	GAVAEVLSSI	340273	ABCB5
91	SSLEPQIQPV	23029	RBM34
92	LLRGPPVARA	3486	IGFBP3
93	SLLTQIFL	151295	SLC23A3

**Таблица 1Б: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением, связывающиеся с молекулами HLA II класса.**

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
94	LKMENKEVLPQLVDAV TS	4547	MTTP
95	GLYLPLFKPSVSTSKAIG GGP	10165	SLC25A13

**Таблица 1В: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением, связывающиеся с молекулами HLA-A\*24.**

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
96	YYTQYSQTI	25878	MXRA5
97	TYTFLKETF	203238	CCDC171
98	VFPRLHNVLF	9816	URB2
99	QYILAVPVL	91147	TMEM67
100	VYIESRIGTSTSF	10112	KIF20A
101	IYIPVLPPHL	163486	DENND1B
102	VYPFENFEF	127700	OSCP1
103	NYIPVKNGKQF	3096	HIVEP1
104	SYLTWHQQI	125919	ZNF543
105	IYNETITDLL	1062	CENPE
106	IYNETVRDLL	3833	KIFC1
107	KYFPYLVVI	80131	LRRC8E
108	PYLVVIHTL	80131	LRRC8E
109	LFITGGQFF	114134	SLC2A13
110	SYPKIIIEF	2177	FANCD2
111	VYVQILQKL	4998	ORC1
112	IYNFVESKL	4998	ORC1
113	IYSFHTLSF	55183	RIF1
114	QYLDGTWSL	55083	KIF26B
115	RYLNKSFVL	63926	ANKRD5
116	AYVIAVHLF	10178	TENM1
117	IYLSDLTYI	55103	RALGPS2
118	KYLNSVQYI	55103	RALGPS2
119	VYRVYVTF	57089	ENTPD7
120	GYIEHFSLW	5069	PAPPA
121	RYGLPAAWSTF	79713	IGFLR1
122	EYQARIPEF	55758	RCOR3
123	VYTPVLEHL	5591	PRKDC
124	TYKDYVDLF	5591	PRKDC
125	VFSRDFGLLVF	5591	PRKDC
126	PYDPALGSPSRLF	389058	SP5
127	QYFTGNPLF	3237	HOXD11
128	VYPDFWQYI	7941	PLA2G7
129	KYIDYLMTW	55233,92597	MOB1A, MOB1B
130	VYAHYHQHF	55233,92597	MOB1A, MOB1B
131	EYLDRIQLFF	51608	GET4
132	RYPALFPVL	11237	RNF24
133	KYLEDMKTYF	5273	SERPINB10
134	AYIPTPIYF	81796	SLCO5A1
135	VYEAMVPLF	85465	EPT1
136	IYPEWPVVF	51146	A4GNT

137	EYLNCSYF	25909,285116	AHCTF1, AHCTF1P1
138	VYNAVSTSF	79915	ATAD5
139	IFGIFPNQF	79895	ATP8B4
140	RYLINSYDF	84002	B3GNT5
141	SYNGHLTIWF	56245	C21orf62
142	VYVDDIYVI	57082	CASC5
143	KYIFQLNEI	347475	CCDC160
144	VFASLPGFLF	1233	CCR4
145	VYALKVRTI	1237	CCR8
146	NYYERIHAI	8832	CD84
147	LYLAFPLAF	253782	CERS6
148	SYGTVSQIF	23601	CLEC5A
149	SYGTVSQI	23601	CLEC5A
150	IYITRQFVQF	81501	DCSTAMP
151	AYISGLDVF	8632	DNAH17
152	KFFDDLGDLELF	8632	DNAH17
153	VYVPFGGKSMITF	146754	DNAH2
154	VYGVPTPHF	151651	EFHB
155	IYKWITDNF	2302	FOXJ1
156	YYMELTKLLL	51659	GINS2
157	DYIPASGFALF	84059	GPR98
158	IYEETRGVLKVF		HIST4H4, HIST2H4B, HIST1H4I, HIST1H4A, HIST1H4D, HIST1H4F, HIST1H4K, HIST1H4J, HIST1H4C, HIST1H4H, HIST1H4B, HIST1H4E, HIST1H4L, HIST2H4A
159	IYEETRGVL	121504, 554313, 8294, 8359, 8360, 8361, 8362, 8363, 8364, 8365, 8366, 8367, 8368, 8370	
160	RYGDGGSSF	3188	HNRNPH2
161	KYPDIVQQF	29851	ICOS
162	KYTSYILAF	3458	IFNG
163	RYLTISNLQF	28785	IGLV4-60
164	HYVPATKVF	259307	IL4I1
165	EYFTPLLSGQF	55175	KLHL11
166	FYTLPFHLI	55175	KLHL11
167	RYGFYYVEF	197021	LCTL
168	RYLEAALRL	10609	LEPREL4
169	NYITGKGDVF	84125	LRRIQ1
170	QYPFHVPLL	4049	LTA
171	NYEDHFPLL	4109	MAGEA10
172	VFIFKGNEF	4319	MMP10
173	QYLEKYYNL	4319	MMP10
174	VYEKNGYIYF	4322	MMP13
175	LYSPVPFTL	387521	TMEM189

176	FYINGQYQF	55728	N4BP2
177	VYFKAGLDVF	254827	NAALADL2
178	NYSSAVQKF	4983	OPHN1
179	TYIPVGLRLL	58495	OVOL2
180	KYLQVVGMF	5021	OXTR
181	VYPPYLNLY	5241	PGR
182	AYAQLGYLLF	9033	PKD2L1
183	PYLQDVPRI	92340	C17orf72
184	IYSVGFENF	389677	RBM12B
185	QYLHVHNDL	23322	RPGRIP1L
186	VFTTSSNIF	10371	SEMA3A
187	AYAANVHYL	151473	SLC16A14
188	GYKTFFNEF	64078	SLC28A3
189	AYFKQSSVF	54790	TET2
190	LYSELTETL	54790	TET2
191	TYPDGTYTGRIF	201633	TIGIT
192	RYSTFSEIF	8277	TKTL1
193	LYLENNAQTQF	8626	TP63
194	VYQSLNSL	286827	TRIM59
195	AYIKGGWIL	125488	TTC39C
196	GYIRGSWQF	79465	ULBP3
197	IFTDIFHYL	54464	XRN1
198	DYVGFTLKI	19	ABCA1
199	SYLNHLNNL	154664	ABCA13
200	VFIHHLPQF	116285	ACSM1
201	GYNPNRVFF	158067	AK8
202	RYVEGIVSL	246	ALOX15
203	VYNVEVKNAEF	84250	ANKRD32
204	EYLSTCSKL	196528	ARID2
205	VYPVVLNQI	79798	ARMC5
206	NYLDVATFL	10973	ASCC3
207	LYSDAFKFIVF	344905	ATP13A5
208	TYLEKIDGF	100526740,26024,955 1	ATP5J2-PTCD1, PTCD1, ATP5J2
209	AFIETPIPLF	631	BFSP1
210	IYAGVGEFSF	701	BUB1B
211	VFKSEGAYF	375444	C5orf34
212	SYAPPSDLF	100533105,23678	SGK3
213	SYAPPSDLFL	100533105,23678	SGK3
214	KYLMELTLI	9133	CCNB2
215	SYVASFFLL	9398	CD101
216	FYVNVKEQF	79682	MLF1IP
217	IYISNSIYF	54967	CXorf48

218	LYSELNKWSF	1591	CYP24A1
219	SYLKAVFNL	163720,199974	CYP4Z2P, CYP4Z1
220	SYSEIKDFL	64421	DCLRE1C
221	KYIGNLDLL	8701	DNAH11
222	HYSTLVHMF	8701	DNAH11
223	TFITQSPLL	1767	DNAH5
224	PYFFANQEF	79843	FAM124B
225	TYTNTLERL	55719	FAM178A
226	MYLKLVLQF	2175	FANCA
227	IYRFITERF	2301	FOXE3
228	IYQYVADNF	2299	FOXI1
229	IYQFVADSF	344167	FOXI3
230	TYGMVMVTF	84059	GPR98
231	AFADVSVKF	84059	GPR98
232	YYLSDSPLL	51512	GTSE1
233	QYLTAALHNL	3552	IL1A
234	SYLPAIWLL	3641	INSL4
235	VYKDSIYYI	84541	KBTBD8
236	VYLPKIPSW	157855	KCNU1
237	KYVGQLAVL	9928	KIF14
238	SYLEKVRQL	100653049,3881,3883 ,3884,3885,3886	KRT31, KRT33A, KRT33B, KRT34, KRT35
239	VYAIFRILL	987	LRBA
240	YYFFVQEKI	84944	MAEL
241	SYVKVLHHL	101060230,4111	MAGEA12
242	VYGEPRELL	392555,51438	MAGEC2
243	SYLELANTL	4163	MCC
244	VHFEDTGKTLF	4322	MMP13
245	LYPQLFVVL	377711,727957	MROH1
246	KYLSVQLTL	339766	MROH2A
247	SFTKTSPNF	200958	MUC20
248	AFPTFSVQL	4588	MUC6
249	RYHPTTCTI	4608	MYBPH
250	KYPDIASPTF	89795	NAV3
251	VYTKALSSL	64151	NCAPG
252	AFGQETNVPLNNF	4695	NDUFA2
253	IYGFFNENF	10886	NPFFR2
254	KYLESSATF	91181	NUP210L
255	VYQKIILKF	139135	PASD1
256	VFGKSAYLF	118987	PDZD8
257	IFIDNSTQPLHF	5288	PIK3C2G
258	AYAQLGYLL	9033	PKD2L1
259	YFIKSPPSQLF	79949	PLEKHS1

260	VYMNVMTRL	5523	PPP2R3A
261	GYIKLINFI	10196	PRMT3
262	VYSSQFETI	23362	PSD3
263	RYILENHDF	442247	RFPL4B
264	LYTETRLQF	26150	RIBC2
265	SYLNEAFSF	286205	SCAI
266	KYTDWTEFL	57713	SFMBT2
267	SFLNIEKTEILF	347051	SLC10A5
268	IFITKALQI	159371	SLC35G1
269	QYPYLQAFF	146857	SLFN13
270	YYSQESKVLYL	55181	SMG8
271	RFLMKSYSF	8435	SOAT2
272	RYVFPLPYL	8403	SOX14
273	IYGEKLQFIF	57405	SPC25
274	KQLDIANYELF	51430	SUCO
275	KYGTLDVTF	255928	SYT14
276	QYLDVLHAL	51256	TBC1D7
277	FYTFPFQQL	6996	TDG
278	KYVNLMVMYF	116238	TLCD1
279	VWLPASVLF	85019	TMEM241
280	TYNPNLQDKL	5651	TMPRSS15
281	NYSPGLVSLIL	28677	TRAV9-2
282	NYLVDPVTI	129868,653192	TRIM43, TRIM43B
283	EYQEIFQQL	129868,653192	TRIM43, TRIM43B
284	DYLKDPVTI	391712,653794	TRIM61, TRIM60P14
285	VYVGDALLHAI	7223	TRPC4
286	SYGTILSHI	54986	ULK4
287	IYNPNLLTASKF	81839	VANGL1
288	VYPDTVALTF	284403	WDR62
289	FFHEGQYVF	389668	XKR9
290	KYGDFKLLEF	143570	XRRA1
291	YYLGSGRETF	152002	XXYL1
292	FYPQIINTF	79776	ZFHX4
293	VYPHFSTTNI	79776	ZFHX4
294	RFPVQGTVTF	79818	ZNF552
295	SYLVIHERI	84775	ZNF607
296	SYQVIFQHF	344905	ATP13A5
297	TYIDTRTVF	827	CAPN6
298	AYKSEVVYF	441402,728577,79937	CNTNAP3B, CNTNAP3
299	KYQYVLNEF	400823	FAM177B
300	TYPSQLPSL	26290	GALNT8
301	KFDDVTMLF	2977	GUCY1A2
302	LYLPVHYGF	253012	HEPACAM2

303	LYSVIKEDF	285600	KIAA0825
304	EYNEVANLF	57097	PARP11
305	NYENKQYLF	144406	WDR66
306	VYPAEQPQI	2334	AFF2
307	GYAFTLPLF	440138	ALG11
308	TFDGHGVFF	29785	CYP2S1
309	KYYRQTLLF	27042	DIEXF
310	IYAPTLLVF	23341	DNAJC16
311	EYLQNLNHI	79659	DYNC2H1
312	SYTSVLSRL	57724	EPG5
313	KYTHFIQSF	26301	GBGT1
314	RYFKGDYSI	3709	ITPR2
315	FYIPHPVVSF	89866	SEC16B
316	VYFEGSDFKF	55164	SHQ1
317	VFDTSIAQLF	6477	SIAH1
318	TYSNSAFQYF	28672	TRAV12-3
319	KYSDVKNLI	57623	ZFAT
320	KFILALKVLF	6790	AURKA

**Таблица 2А: Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением, связывающиеся с молекулами HLA-A\*02.**

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
321	SLWFKPEEL	4831,654364	NME2, NME1-NME2
322	ALVSGGVAQA	64326	RFWD2
323	ILSVVNSQL	80183	KIAA0226L
324	AIFDFCPSV	23268	DNMBP
325	RLLPKVQEV	168417,89958	ZNF679, SAPCD2
326	SLLPLVWKI	1130	LYST
327	SIGDIFLKY	1894	ECT2
328	SVDSAPAAV	10635	RAD51AP1
329	FAWEPSFRDQV	1244	ABCC2
330	FLWPKEVEL	146206	RLTPR
331	AIWKELISL	55183	RIF1
332	AVTKYTSAK	54145,85236,8970	H2BFS, HIST1H2BK, HIST1H2BJ
333	GTFLEGVAK	126328	NDUFA11
334	GRADALRVL	79713	IGFLR1
335	VLLAAGPSAA	23225	NUP210
336	GLMDGSPHFL	157680	VPS13B
337	KVLGKIEKV	987	LRBA
338	LLYDGKLSSA	987	LRBA
339	VLGPGPPPL	254359	ZDHC24
340	SVAKTILKR	55233,92597	MOB1A, MOB1B

**Таблица 2Б: Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением, связывающиеся с молекулами HLA-A\*24.**

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
341	SYLTQHQRI	162655,344065,9422	ZNF519, ZNF264
342	NYAFLHRTL	200316,9582	APOBEC3F, APOBEC3B
343	NYLGGTSTI	367	AR
344	EYNSDLHQF	699	BUB1
345	EYNSDLHQFF	699	BUB1
346	IYVIPQPHF	57082	CASC5
347	VYAEVNSL	1459	CSNK2A2
348	IYLEHTESI	2177	FANCD2
349	QYSIISNVF	28982	FLVCR1
350	KYGNFIDKL	85865	GTPBP10
351	IFHEVPLKF	728432,79664	NARG2
352	QYGGDLTNTF	3673	ITGA2
353	TYGKIDLGF	57650	KIAA1524
354	VYNEQIRDLL	81930	KIF18A
355	IYVTGGHLF	113730	KLHDC7B
356	NYMPGQLTI	346389	MACC1
357	QFITSTNTF	94025	MUC16
358	YYSEVPVKL	25878	MXRA5
359	NYGVLHVTF	204801	NLRP11
360	VFSPDGHLF	143471,5688	PSMA8, PSMA7
361	TYADIGGLDNQI	5700	PSMC1
362	VYNYAEQTL	100526737,10432,5936	RBM14-RBM4, RBM14, RBM4
363	SYAELGTTI	23657	SLC7A11
364	KYLNENQLSQL	6491	STIL
365	VFIDHPVHL	26011	TENM4
366	QYLELAHSL	4796	TONSL
367	LYQDHMQYI	7474	WNT5A
368	KYQNVKHNL	79830	ZMYM1
369	VYTHEVVTL	983	CDK1
370	RFIGIPNQF	79659	DYNC2H1
371	AYSHLRYVF	2195	FAT1
372	VYVIEPHSMEF	23225	NUP210
373	GYISNGELF	116143,5534,5535	WDR92, PPP3R1, PPP3R2
374	VFLPRVTEL	5591	PRKDC
375	KYTDYILKI	374462	PTPRQ
376	VYTPVASRQSL	56852	RAD18
377	QYTPHSHQF	57521	RPTOR
378	VYIAELEKI	27127	SMC1B

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
379	VFIAQGYTL	160418	TMTC3
380	VYTGIDHHW	25879	DCAF13
381	KYPASSSVF	3217	HOXB7
382	AYLPPLQQVF	26523	EIF2C1
383	RYKPGEPITF	163486	DENND1B
384	RYFDVGLHNF	55733	HNAT
385	QYIEELQKF	55103	RALGPS2
386	TFSDVEAHF	55609	ZNF280C
387	KYTEKLEEI	95681	CEP41
388	IYGEKTYAF	5273	SERPINB10

**Таблица 3: Пептиды, полезные для противораковой терапии в соответствии с изобретением, например, для персонализированной противораковой терапии.**

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
389	EYLPEFLHTF	154664	ABCA13
390	RYLWATVTI	259266	ASPM
391	LYQILQGIVF	983	CDK1
392	RYLDSLKAIVF	55839	CENPN
393	KYIEAIQWI	81501	DCSTAMP
394	FYQPKIQQF	55215	FANCI
395	LYINKANIW	55632	G2E3
396	YYHFIFTTL	2899	GRIK3
397	IYNGKLFDL	11004	KIF2C
398	IYNGKLFDLL	11004	KIF2C
399	SYIDVLPEF	4233	MET
400	KYLEKYYNL	4312	MMP1
401	VFMKDGFFYF	4312	MMP1
402	VWSDVTPLTF	4320	MMP11
403	TYKYVDINTF	4321	MMP12
404	RYLEKFYGL	4321	MMP12
405	NYPKSIHSF	4321	MMP12
406	TYSEKTTLF	94025	MUC16
407	VYGIRLEHF	83540	NUF2
408	QYASRFVQL	10733	PLK4
409	YFISHVLAF	6241	RRM2
410	RFLSGIINF	83540	NUF2
411	VYIGHTSTI	23499,93035	MACF1, PKHD1L1
412	SYNPLWLRI	259266	ASPM
413	NYLLYVSNF	4486	MST1R
414	MYPYIYHVL	54954	FAM120C
415	SYQKVIELF	55872	PBK
416	AYSDBGHFLF	26011	TENM4

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
417	VYKVVGNLL	128239	IQGAP3

Настоящее изобретение также, в основном, относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении пролиферативных заболеваний, например, глиобластомы (ГБ), рака молочной железы (РМЖ), колоректального рака (КРК), почечноклеточной карциномы (ПКК), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), гепатоклеточной карциномы (ГКК), немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких (НМРЛ, МРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака яичника (РЯ), рака поджелудочной железы (РПЖ), рака предстательной железы (РПрЖ), рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода (РП), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), меланомы (МЕЛ), рака желудка (РЖ), рака яичка (ТР), рака мочевого пузыря (РМП), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) и рака матки (РЭМ).

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: 388. Особенно предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 295 (см. Таблицу 1А, Б, В), и их применение в иммунотерапии глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или 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: 70, 80, 323 и 325. Более предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 70, 80, 323 и 325, и их применение в иммунотерапии

глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки.

Также предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – в соответствии с настоящим изобретением, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 391 и 403. Более предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 391 и 403, и их применение в иммунотерапии глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки.

Как показано в Примере 1, многие из пептидов в соответствии с настоящим изобретением присутствуют в различных других видах опухолей и могут, таким образом, применяться в иммунотерапии при различных показаниях. Избыточная экспрессия лежащих в основе полипептидов при различных видах рака, как представлено в Примере 2, предполагает пригодность этих пептидов при различных других онкологических показаниях.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением – предпочтительно в комбинации – в лечении пролиферативного заболевания, выбранного из группы: глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-

желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака 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: 388.

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.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к не встречающемуся в природе пептиду, где указанный пептид состоит или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No: 1 по SEQ ID No: 48 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  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$  и в качестве катионов  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$ . В частности, соли выбраны из  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Br}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{I}$ ,  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ,  $\text{Rb}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Rb}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{RbH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Rb}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ,  $\text{Rb}_4\text{Cl}$ ,  $\text{Rb}_4\text{Br}$ ,  $\text{Rb}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Rb}_4\text{ClO}_4$ ,  $\text{Rb}_4\text{I}$ ,  $\text{Rb}_4\text{SCN}$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KBr}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KClO}_4$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{KSCN}$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{NaI}$ ,  $\text{NaSCN}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Cs}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Cs}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CsH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CsCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{CsCl}$ ,  $\text{CsBr}$ ,  $\text{CsNO}_3$ ,  $\text{CsClO}_4$ ,  $\text{CsI}$ ,  $\text{CsSCN}$ ,  $\text{Li}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Li}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{LiH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{LiCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{LiBr}$ ,  $\text{LiNO}_3$ ,  $\text{LiClO}_4$ ,  $\text{LiI}$ ,  $\text{LiSCN}$ ,  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Mg}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgBr}_2$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{MgI}_2$ ,  $\text{Mg}(\text{SCN})_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaBr}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{CaI}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{SCN})_2$ ,  $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ba}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{BaSO}_4$ ,  $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{BaBr}_2$ ,  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{BaI}_2$  и  $\text{Ba}(\text{SCN})_2$ . Особенно предпочтительными являются ацетат NH,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$  и  $\text{CaCl}_2$ , такие как например, хлоридные или ацетатные (трифторацетатные) соли.

Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высокощелочлабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонилла (в случае аргинина). Если глутамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамин (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина

(функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксисукусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глутамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксибензотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

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

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептиды в соответствии с 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.: 388, предпочтительно содержащий SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 295 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 aberrantly 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 лекарственного средства или в изготовлении лекарственного средства. Предпочтительно, если указанное лекарственное средство обладает активным противораковым действием.

Предпочтительно, если указанное лекарственное средство предназначено 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, называемым в настоящем контексте «мишени», которые могут применяться в диагностике рака, предпочтительно, глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки. 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.

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

A4GNT часто экспрессируется в клетках рака поджелудочной железы, но не в клетках периферической крови. Количественный анализ мРНК A4GNT, экспрессируемой во фракции мононуклеарных клеток периферической крови будет содействовать выявлению рака поджелудочной железы (Ishizone et al., 2006). Обнаружение мРНК A4GNT было возможно у 80% пациентов с раком желудка ранней стадии, когда раковые клетки находились в пределах слизистой оболочки желудка, и уровни экспрессии мРНК A4GNT были повышены в ассоциации с прогрессирующей опухолью (Shimizu et al., 2003).

Повышенный уровень экспрессии ABCC2 в клетках первичных карцином маточных труб ассоциируется с неблагоприятным прогнозом (Halon et al., 2013).

При раке у человека уровень ADAM10 повышен, при этом уровни обычно коррелируют с параметрами прогрессирования опухоли и неблагоприятным исходом. В доклинических моделях селективный ингибитор ADAM10, как было показано, действует синергически совместно с существующими видами терапии, сокращая рост опухоли (Duffy et al., 2009).

Как было продемонстрировано, уровень ANCYL2 снижен при карциноме толстой кишки и при нескольких подвидах карцином легких (Lleonart et al., 2006). Экспрессию мРНК ANCYL2 описывали как потенциально ассоциированную с контролем функции p53 в равной степени, как и сигнального пути gas-MAPK, клеточными программами метилирования и транскрипции, и ANCYL2, таким образом, может быть регуляторным геном-супрессором, участвующим в процессах, связанных с опухолями толстой кишки и легких у человека (Lleonart et al., 2006).

AKR1C1 играет роль в развитии резистентности к цисплатину клетками рака шейки матки, яичника и легких, что включает деполяризацию мембраны митохондрий, образование АФК и активацию сигнального пути JNK (Chen et al., 2015). Значительно более высокие уровни

AKR1C1 внутри опухоли были обнаружены у пациентов, отвечающих на неoadъювантную терапию по сравнению с теми, у кого не наблюдалось ответа (Hlavac et al., 2014).

Как было продемонстрировано, экспрессия AKR1C3 позитивно коррелирует с более высоким баллом по Глисон у при раке предстательной железы, указывая на то, что AKR1C3 может служить в качестве многообещающего биомаркера прогрессирования рака предстательной железы (Tian et al., 2014). AKR1C3, как было показано, катализирует восстановление 4-андростен-3,17-диона до тестостерона и эстрогена до 17 $\beta$ -эстрадиола, что способствует пролиферации гормон-зависимых видов рака предстательной железы и молочной железы, соответственно (Byrns et al., 2011). Уровень AKR1C3, как было показано, повышен при раке молочной железы, раке предстательной железы и плоскоклеточной карциноме кожи (Byrns et al., 2011; Mantel et al., 2014). Как было продемонстрировано, AKR1C3 является маркером внутри генетической подгруппы, который способен разделить пациентов на дающих и не дающих ответ при применении радиохимиотерапии в лечении пациентов с локально распространенным раком прямой кишки (Agostini et al., 2015). AKR1C3, как было показано, ассоциируется с резистентностью к доксорубину при раке молочной железы человека за счет активации антиапоптотического сигнального пути PTEN/Akt в связи с потерей гена-супрессора PTEN (Zhong et al., 2015). AKR1C3, как было показано, ассоциируется с более высоким риском возникновения рака легких среди популяции китайцев, которые были подвержены воздействию выбросов от каменного угля (Li et al., 2015a). AKR1C3 описывали в качестве потенциального терапевтического маркера хориокарциномы, который также ассоциируется с развитием резистентности к метотрексату при данном заболевании (Zhao et al., 2014a).

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

ALOX15 присутствует на высоком уровне при раке предстательной железы (РПЖ), раке легких, раке молочной железы, меланомах и аденокарциномах толстой кишки при сравнении с нормальными тканями (Kelavkar et al., 2002). Ферментативная активность ALOX15 способствует развитию и прогрессированию РПЖ (Kelavkar et al., 2007).

AR был задействован в развитии различных видов рака, таких как рак предстательной железы, кастрат-резистентный рак предстательной железы, рак молочной железы, мультиформная глиобластома, рак толстой кишки и желудка (Wang et al., 2009b; Yu et al., 2015b; Mehta et al., 2015; Wang et al., 2015a; Sukocheva et al., 2015). В дополнение к стимуляции пролиферации рака предстательной железы, сигнальные пути андрогенов с участием AR ведут к апоптозу посредством индукции экспрессии p21 (WAF1/CIP1), ингибитора циклин-зависимой киназы (Yeh et al., 2000).

Мутации гена ARMC5 вызывают крупноузловые опухоли, продуцирующие кортизол, билатеральные крупноузловые гиперплазии, первичные крупноузловые гиперплазии надпочечников и менингиому (Espiard and Bertherat, 2015; Kirschner and Stratakis, 2016; Elbelt et al., 2015).

Фармакогеномные исследования выявили корреляции между ATAD5 и противораковыми препаратами (Abaan et al., 2013). Уровень ATAD5 существенно повышен при злокачественных опухолях оболочки периферийных нервов (Pasmant et al., 2011). Белок X вируса гепатита В существенно повышает уровень экспрессии ATAD5 при гепатоклеточной карциноме, ассоциированной с вирусом гепатита В (Ghosh et al., 2016). Потеря ATAD5 приводит к летальному исходу у мышинных эмбрионов, он действует как супрессор опухоли как у мышей, так и у человека, и он взаимодействует с компонентами сигнального пути анемии Фанкони человека. Кроме того, он может быть ответственным за некоторые из фенотипов, ассоциированных с нейрофиброматозом, наследственным заболеванием с высоким риском развития опухоли (Gazy et al., 2015; Jenne et al., 2001). Варианты локуса гена ATAD5 ассоциируются с риском развития эпителиального рака яичника (Kuchenbaecker et al., 2015). ATAD5 имеет отношение по меньшей мере к одному фенотипу немелкоклеточного рака легких человека (Li et al., 2014).

Регуляция экспрессии ATR10B нарушена в высоко инвазивных клетках глиомы и ассоциируется с инвазивным поведением опухоли (Tatenhorst et al., 2004).

ATR8B4 может быть прогностическим маркером и терапевтической мишенью у пациентов с множественной миеломой и другими видами опухолей (заявка на патент США № 20070237770 A1) (Ni et al., 2012).

ATR кодирует ATR серин/треонинкиназу, которая принадлежит к семейству PI3/PI4-киназ. Увеличение числа копий, амплификация или транслокация гена ATR наблюдались в клеточных линиях плоскоклеточной карциномы полости рта (Parikh et al., 2014). Было показано, что усекающие мутации ATR при раке эндометрия ассоциируются со снижением выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости (Zigelboim et al., 2009).

B3GNT5 экспрессируется в избытке при остром миелолейкозе и эмбриональной карциноме у мышей, и его экспрессия обратно коррелирует с метилированием промотора при глиобластоме (Ogasawara et al., 2011; Etcheverry et al., 2010; Wang et al., 2012). Снижение уровня B3GNT5 за счет миРНК-203 может вносить свой вклад в развитие злокачественности гипофарингеальной плоскоклеточной карциномы (Wang et al., 2015g). B3GNT5 ассоциируется с выживаемостью пациентов при раке молочной железы (Potapenko et al., 2015).

Экспрессия Bub1 повышена в подгруппе лимфом, рака молочной железы, желудка и предстательной железы. Избыточная экспрессия Bub1 коррелирует с неблагоприятным клиническим прогнозом (Ricke and van Deursen, 2011). Мутации Bub1 могут быть обнаружены при колоректальных карциномах, демонстрирующих хромосомную нестабильность (Williams et al., 2007).

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

В линии клеток ЛНЗ острого миеломоноцитарного лейкоза делеция в хромосоме включает C7orf10 (Pan et al., 2012).

C8 конститутивно экспрессируется линией клеток HepG2 гепатомы человека, и уровень экспрессии сильно повышен после стимуляции цитокинами ИЛ-6, IFN-гамма и ИЛ-1 бета (Scheurer et al., 1997).

Специфические праймеры раково-тестикулярного антигена позволяют обнаружить CASC5 при мультиформной глиобластоме, одном из наиболее злокачественных и агрессивных видов

опухолей с крайне неблагоприятным прогнозом. CASC5 имеет специфические связывающие мотивы на N-конце (для Bub1 и BubR1) и на C-конце (для Zwint-1 и hMis14/hNsl1). Разрыв этой связи может привести к онкогенезу (Kiyomitsu et al., 2011; Jiang et al., 2014c). CASC5 взаимодействует с геном-супрессором опухоли pRb (Bogdanov and Takimoto, 2008). CASC5 экспрессируется в высокой степени в пролиферирующих соматических клетках, опухолях и в здоровом семеннике человека (Bogdanov and Takimoto, 2008; Sasao et al., 2004). CASC5 связан с подавлением роста клетки и ускорением созревания и, его повреждение, таким образом, может быть ключевым фактором для лейкогенеза (Hayette et al., 2000; Bogdanov and Takimoto, 2008; Chinwalla et al., 2003; Kuefer et al., 2003; Yang et al., 2014a).

CCR4 описывают как прогностический маркер различных видов опухолей, таких как почечноклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак желудка, рак молочной железы, рак толстой кишки и ходжкинская лимфома (Ishida et al., 2006; Olkhanud et al., 2009; Yang et al., 2011; Tsujikawa et al., 2013; Al-haidari et al., 2013; Liu et al., 2014a). Исследования выявили, что пациенты с раком желудка с CCR4-положительными опухолями имели значительно худший прогноз по сравнению с теми, чьи опухоли были CCR4-негативными (Lee et al., 2009a).

Уровень экспрессии CCR8 повышен в таких миелоидных клетках как моноциты и гранулоциты в периферической крови пациентов с уротелиальными и почечными карциномами. Повышенный уровень экспрессии CCR8 также обнаруживается в тканях рака мочевого пузыря и почки человека и главным образом ограничивается опухолеассоциированными макрофагами. Ось CCL1/CCR8 является компонентом связанного с раком воспаления и может вносить свой вклад в уклонение от иммунного ответа (Eruslanov et al., 2013).

Однонуклеотидный полиморфизм гена CD101, как было показано, ассоциируется с риском развития рака поджелудочной железы, однако результаты не удалось повторить в исследовании по схеме случай-контроль и в когортном исследовании пациентов с раком предстательной железы, таким образом, может потребоваться в будущем проведение дополнительных исследований возможной роли CD101 при раке поджелудочной железы (Reid-Lombardo et al., 2011). CD101 был идентифицирован как один из 6 генов генетической подписи, которые позволяют отличить хроническую фазу хронического миелолейкоза от фазы бластного криза при использовании модели байесовского усреднения (Oehler et al., 2009).

CD84 описывали как CD-антиген, который иначе распространен при прогрессирующем хроническом лимфоцитарном лейкозе по сравнению с медленно прогрессирующим и стабильным хроническим лимфоцитарным лейкозом (Huang et al., 2014). Уровень экспрессии CD84, как было показано, существенно повышается с ранних стадий хронического лимфоцитарного лейкоза (Binsky-Ehrenreich et al., 2014).

Уровни экспрессии CENPE значимо коррелируют со степенью злокачественности глиом и могут дополнять другие параметры по предсказанию времени выживания пациентов, больных глиомой (Bie et al., 2011). Уровень CENPE повышен в резистентных к химиотерапии эпителиальных опухолях яичника по сравнению с химиочувствительными опухолями (Ju et al., 2009). Уровень CENPE повышен при инвазивных и агрессивных инвазивных пролактин-секретирующих опухолях гипофиза (Wierinckx et al., 2007).

Было продемонстрировано, что уровень CLDN14 повышен при раке желудка (Gao et al., 2013). Как было продемонстрировано, экспрессия CLDN14 ассоциируется с метастазами в лимфатические узлы при раке желудка (Gao et al., 2013). CLDN14, как описывалось, играет роль в регуляции целостности кровеносных сосудов опухоли и ангиогенеза у мышей (Baker et al., 2013).

CLDN3 экспрессируется в высокой степени дифференциально при многих опухолях человека и может представлять собой эффективный молекулярный инструмент для специфической идентификации клеток биологически агрессивных форм рака человека и нацеливания на них, так как CLDN3 является высокоаффинным рецептором энтеротоксина *Clostridium perfringens* (Black et al., 2015). CLDN3 часто экспрессируется в избытке при некоторых неоплазиях, включая рак яичника, молочной железы, поджелудочной железы и предстательной железы (Morin, 2005). CLDN3 был идентифицирован как биомаркер рака предстательной железы, поскольку он экспрессируется в высокой степени при раке предстательной железы (Amago et al., 2014). Снижение уровня экспрессии CLDN3 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) после полной резекции плоскоклеточной карциномы легких (Che et al., 2015). CLDN3 ингибирует агрессивность рака за счет сигнального пути Wnt-EMT и является потенциальным прогностическим биомаркером гепатоклеточной карциномы (Jiang et al., 2014b).

CLDN4 экспрессируется в высокой степени дифференциально при многих опухолях человека и может представлять собой эффективный молекулярный инструмент для специфической идентификации клеток биологически агрессивных форм рака человека и нацеливания на них, так как CLDN4 является высокоаффинным рецептором энтеротоксина *Clostridium perfringens* (Black et al., 2015). CLDN4 часто экспрессируется в избытке при некоторых неоплазиях, включая рак яичника, молочной железы, поджелудочной железы и предстательной железы (Morin, 2005). Антитело к внеклеточному домену CLDN4 способствует химиотерапевтическому воздействию при раке мочевого пузыря (Kuwada et al., 2015). Высокий уровень экспрессии CLDN4 ассоциировался с более дифференцированной карциномой желудка кишечного типа, и он отсутствовал при плохо дифференцированном диффузном типе. Низкий уровень экспрессии CLDN4 был связан с лимфангиогенезом (Shareef et al., 2015).

Экспрессия CLDN6, как было продемонстрировано, ассоциируется с метастазами в лимфатические узлы и стадией по TNM при немелкоклеточном раке легких (Wang et al., 2015f). Кроме того, низкий уровень экспрессии CLDN6, как было показано, ассоциируется с существенно более низким уровнем выживаемости у пациентов с немелкоклеточным раком легких (Wang et al., 2015f). Таким образом, низкий уровень экспрессии CLDN6 является независимым прогностическим биомаркером, который указывает на худший прогноз для пациентов с немелкоклеточным раком легких (Wang et al., 2015f). Уровень CLDN6, как было показано, понижен при карциноме шейки матки и раке желудка (Zhang et al., 2015; Lin et al., 2013). Уровень CLDN6, как было показано, повышен при связанном с BRCA1 раком молочной железы и серозной папиллярной карциноме яичника (Wang et al., 2013b; Heerma van Voss et al., 2014). CLDN6 описывали в качестве гена-супрессора опухоли рака молочной железы (Zhang et al., 2015). Увеличение экспрессии CLDN6 в линиях клеток HeLa и C33A карциномы шейки матки, как было показано, подавляет пролиферацию и образование колоний клеток *in vitro* и рост опухоли *in vivo*, позволяя предположить, что CLDN6 может выполнять функцию гена-супрессора опухоли в клетках карциномы шейки матки (Zhang et al., 2015). CLDN6 может играть положительную роль в процессе инвазии и метастазирования рака яичника (Wang et al., 2013b). Было продемонстрировано, что CLDN6 устойчиво экспрессировался в герминогенных опухолях и, таким образом, является новым диагностическим маркером примитивных герминогенных опухолей (Ushiku et al., 2012). Позитивная экспрессия CLDN6 была продемонстрирована в большинстве опухолей оцененного ряда атипичных

тератоидных/рабдоидных опухолей центральной нервной системы, при этом сильная позитивность CLDN6 является потенциальным независимым прогностическим фактором для исхода заболевания (Dufour et al., 2012).

Уровень CLDN9, как было показано, повышен в линии клеток р-3LL метастатической карциномы легких Льюис и опухолях, образованных из этих клеток, и в онкоцитомах гипофиза (Sharma et al., 2016; Hong et al., 2014). Нокдаун экспрессии CLDN9 в клетках р-3LL метастатической карциномы легких Льюис, как было показано, приводит к значительному снижению подвижности, инвазивности *in vitro* и метастазирования *in vivo*, тогда как кратковременная избыточная экспрессия в этих клетках, как было продемонстрировано, усиливает их подвижность (Sharma et al., 2016). Таким образом, CLDN9 может играть незаменимую роль в стимуляции метастазирования рака легких (Sharma et al., 2016). Уровень CLDN9, как было продемонстрировано, снижен в тканях карциномы шейки матки (Zhu et al., 2015a). Наблюдалось, что экспрессия CLDN9 коррелирует с метастазами в лимфатические узлы при карциномах шейки матки (Zhu et al., 2015a). CLDN9 описывали как ген, имеющий наиболее значимые изменения и повышенный уровень при онкоцитомах гипофиза, с более высоким уровнем экспрессии при инвазивных онкоцитомах в сравнении с неинвазивными формами (Hong et al., 2014). Таким образом, CLDN9 может быть важным биомаркером инвазивных онкоцитом гипофиза (Hong et al., 2014). Избыточная экспрессия CLDN9 в линии клеток AGS аденокарциномы желудка, как было показано, усиливает инвазивный потенциал, скорость миграции и пролиферации клеток и, таким образом, этого достаточно для усиления онкогенных свойств клеточной линии аденокарциномы желудка (Zavala-Zendejas et al., 2011). Сильная экспрессия CLDN9, как было продемонстрировано, ассоциируется с более высокой смертностью при аденокарциномах желудка диффузного типа в сравнении с кишечным типом, и ее обнаружение описывали как полезный прогностический маркер при аденокарциномах желудка «кишечного» и «диффузного» типа (Rendon-Huerta et al., 2010).

Уровень экспрессии мРНК CLEC5A, как было показано, значительно ниже в образцах пациентов с первичным острым миелоидным лейкозом, чем в макрофагах и гранулоцитах здоровых доноров (Batliner et al., 2011). CLEC5A описывали как новую транскрипционную мишень гена-супрессора опухоли PU.1 в моноцитах/макрофагах гранулоцитах (Batliner et al., 2011).

DCP2 был идентифицирован в качестве мишени miR-224, дифференциальная экспрессия которого более чем в два раза выше в клетках рака толстой кишки человека, резистентных к метотрексату (Mencia et al., 2011).

Экспрессия DCSTAMP повышена при папиллярном раке щитовидной железы (Lee et al., 2009b; Kim et al., 2010b). Снижение уровня DCSTAMP ведет к снижению образования колоний клетками MCF-7, вероятно, по причине снижения пролиферации и замедления клеточного цикла, а также вследствие усиления апоптоза (Zeng et al., 2015). DCSTAMP экспрессируется в избытке периферическими макрофагами, а дендритные клетки и плазматические клетки миеломы демонстрируют высокую восприимчивость к DCSTAMP и способны трансдифференцироваться до остеокластов. Злокачественные плазматические клетки, экспрессирующие фенотип раковых стволовых клеток и имеющие высокую способность к метастазированию экспрессируют маркеры остеокластов, которые активируют транскрипционный сигнальный путь бета3, приводя к фосфорилированию ERK1/2 и инициации костной резорбции (Silvestris et al., 2011). Эскулетин и партенолид подавляют c-Fos и ядерный фактор c1 активированного T-клеточного сигнального пути, приводя к подавлению экспрессии DCSTAMP, гена-маркера дифференциации остеокластов (Ihn et al., 2015; Baek et al., 2015; Cicek et al., 2011; Courtial et al., 2012; Kim et al., 2014a).

Однонуклеотидные полиморфизмы DENND1B значимо ассоциировались с риском заболевания раком поджелудочной железы (Cotterchio et al., 2015).

DNAH17, также известный как DNEL2, описывали как гомолог опухолевого антигена, идентифицированного у пациентов с меланомами (Ehlken et al., 2004). DNAH17 описывали в качестве одного из нескольких генов-кандидатов, картированных на небольшом участке хромосомы, ассоциированном с онкогенезом спорадического рака молочной железы и яичника и рака пищевода при аутосомно-доминантных нарушениях, наследственных невралжной амиотрофии и тилозе (Kalikin et al., 1999).

DNAH2 – это один из генов, имеющих мутацию у  $\geq 10\%$  пациентов с хроническим миеломоноцитарным лейкозом (Mason et al., 2015). Гены, кодирующие белки, ассоциированные с микротрубочками, такие как DNAH2, демонстрировали более высокий уровень возникновения генетических aberrаций – на 10% или выше, при светлоклеточных

почечноклеточных карциномах, положительных по фенотипу метилирования CpG-островков (Arai et al., 2015).

Повторная экспрессия подавленных метилированием генов-супрессоров опухоли за счет ингибирования DNMT3B стала эффективной стратегией в борьбе с раком (Singh et al., 2013).

Экспрессия мРНК FAM83B была существенно выше при плоскоклеточной карциноме, чем в нормальных легких или при аденокарциноме, и, таким образом, FAM83B является новым биомаркером для постановки диагноза и составления прогноза (Okabe et al., 2015). FAM83B был идентифицирован в качестве онкогена, задействованного в активации сигнального пути CRAF/MAPK и управлении трансформацией эпителиальных клеток. Повышенные уровни экспрессии ассоциируются с более высокой степенью злокачественности опухоли и снижением общей выживаемости (Cipriano et al., 2014). Повышение уровня экспрессии FAM83B также активирует сигнальный путь PI3K/AKT и способствует снижению чувствительности к ингибиторам PI3K, AKT, и mTOR (Cipriano et al., 2013).

О снижении уровня или нарушении функции FANCD2 в связи с генетическими мутациями сообщалось при различных видах рака, включая рак молочной железы, острый лимфоцитарный лейкоз и саркомы яичка, что ассоциируется с развитием рака. С другой стороны, как было также показано, повторная экспрессия и повышенный уровень FANCD2 ассоциируются с прогрессированием опухоли и метастазами при глиомах и колоректальном раке (Patil et al., 2014; Shen et al., 2015a; Shen et al., 2015b; Ozawa et al., 2010; Rudland et al., 2010; Zhang et al., 2010a; Smetsers et al., 2012). Сигнальный путь PI3K/mTOR/Akt стимулирует FANCD2, индуцируя контрольную точку ATM/Chk2 как ответ на повреждение ДНК, и моноубиквитинированный FANCD2 активирует транскрипцию супрессора опухоли TAp63 (Shen et al., 2013; Park et al., 2013).

Уровень экспрессии FOXJ1 повышен, ассоциируется со стадией, гистологической степенью злокачественности и размером опухоли и коррелирует с прогнозом для пациентов со светлоклеточной почечноклеточной карциномой (Zhu et al., 2015b). Снижение уровня экспрессии FOXJ1 значимо коррелировало с клинической стадией, метастазами в лимфатические узлы и отдаленными метастазами, и более низкая экспрессия FOXJ1 независимо предсказывала более короткий период выживаемости при карциноме желудка

(Wang et al., 2015c). Избыточная экспрессия FOXJ1 может способствовать пролиферации опухолевых клеток и ходу клеточного цикла при гепатоклеточной карциноме и ассоциируется с гистологической степенью злокачественности и неблагоприятным прогнозом (Chen et al., 2013).

Высокий уровень транскриптов GINS2 указывает на неблагоприятный прогноз и коррелирует с высокой гистологической степенью и резистентностью к эндокринной терапии за счет стволовых раковых клеток молочной железы у пациентов с раком молочной железы (Zheng et al., 2014). Сообщалось, что GINS2 присутствует в большом количестве при аденокарциноме легких и ассоциируется со стадиями по TNM (Liu et al., 2013b). GINS2 экспрессируется обильно и аномально при многих злокачественных солидных опухолях, таких как рак молочной железы, меланома и карцинома печени. Кроме того, избыточная экспрессия GINS2 могла способствовать пролиферации линий клеток лейкоза (Zhang et al., 2013a).

Уровень экспрессии GPR98 повышен при первичных нейроэндокринных опухолях по сравнению с нормальной тканью (Sherman et al., 2013). GPR98 является одним из генов, ассоциированных с выживаемостью при мультиформной глиобластоме (Sadeque et al., 2012). GPR98 продуцирует транскрипт, регулируемый глюкокортикоидами, которые применяются для лечения острого лимфобластного лейкоза, поскольку они ведут к индукции апоптоза (Rainer et al., 2012).

GTPBP10 коррелировал в высокой степени с вариацией числа копий, экспрессией гена и исходом для пациента при глиобластоме (Kong et al., 2016).

Экспрессия GTSE1 подавляет апоптотический сигнальный путь и придает клеткам рака желудка резистентность к цисплатину (Subhash et al., 2015). GTSE1 экспрессируется в избытке при лейомиосаркоме матки (ULMS) и участвует в регуляции клеточного цикла.

H2BFS устойчиво экспрессировался как значимый кластер, ассоциированный с подгруппами низкого риска относительно острого лимфобластного лейкоза (Qiu et al., 2003).

Как было показано, уровень HIST1H2BJ снижен при опухолях головного мозга, и описывали его потенциальную пользу для разработки молекулярных маркеров, имеющих диагностическое или прогностическое значение (Luna et al., 2015).

Ацетилирование HISTH4A, возможно, является потенциальной мишенью для инактивации эмбрионального рака почки (опухоль Вильмса) (Yan-Fang et al., 2015).

HIST1H4C может действовать как различающий фактор в отношении развития связанного с лечением миелоидного лейкоза (Vogni et al., 2006).

Гиперметилирование HIST1H4F наблюдалось при раке предстательной железы, что также может коррелировать с возрастом пациента (Kitchen et al., 2016).

Высокая степень метилирования HIST1H4K наблюдалась при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря высокой степени злокачественности, а также при раке предстательной железы и, таким образом, она представляет собой потенциальный биомаркер (Payne et al., 2009; Kachakova et al., 2013).

Было показано, что уровень HIST1H4L значительно повышен при ERG+ карциномах предстательной железы (Camoses et al., 2012). HIST1H4L кодирует кластер гистонов 1, зависимый от репликации, H4I, который является членом семейства гистонов H4 (RefSeq, 2002).

HIST2H4B был идентифицирован как новый белок ключевых клеточных сигнальных путей патогенеза в клетках, инфицированных подтипом реовируса, который изучается сейчас в клинических исследованиях в качестве онколитического противоракового препарата (Berard et al., 2015).

HIST4H4 был одним из генов, который постоянно демонстрировал низкий уровень в клетках рака желудка после лечения иммуноконъюгатами, состоящими из альфа-излучателя и моноклонального антитела d9MAb, специфическими мишенями которого являются клетки, экспрессирующие мутантный d9-E-кадхерин (Seidl et al., 2010). Гиперметилирование других членов семейства гистонов H4 значимо ассоциировалось с более коротким периодом

выживаемости без рецидивов при немелкоклеточном раке легких I стадии (Sandoval et al., 2013).

HIVER1 был идентифицирован в качестве клеточного гена, поврежденного при внедрении Т-лимфотропного вируса человека типа 1 в линии клеток лимфомы (Cao et al., 2015). HIVER1 ассоциировался с неблагоприятной делецией 11q, а также с неблагоприятными стадиями В и С по методу Бине при хроническом лимфоцитарном лейкозе (Aalto et al., 2001).

Уровень экспрессии HNRNP2 повышен при различных видах рака, включая рак поджелудочной железы, печени и рак желудка (Honore et al., 2004; Zeng et al., 2007). HNRNP2 участвует в сплайсинге транскрипта hTERT бета-делецией, который экспрессируется в высокой степени раковыми клетками и конкурирует и, тем самым, ингибирует активность эндогенной теломеразы (Listerman et al., 2013).

Регуляция экспрессии HOXD11 нарушена при плоскоклеточной карциноме головы и шеи, демонстрируя поразительно высокие уровни в линиях клеток и образцах опухолей пациентов. Нокдаун HOXD11 снижал инвазию (Sharpe et al., 2014). Уровень HOXD11 значительно повышен при плоскоклеточной карциноме полости рта (Rodini et al., 2012). HOXD11 aberrантно метилирован при раке молочной железы человека (Miyamoto et al., 2005). Ген HOXD11 слит с геном NUP98 при остром миелолейкозе с t(2;11)(q31;p15) (Taketani et al., 2002).

ICOS выступает в качестве лиганда белка запрограммированной гибели-1 (PD-1) на Т-клетках, вызывает ускользание раковых клеток от иммунного надзора и выступает также в качестве рецептора, опосредующего антиапоптотическое воздействие на раковых клетках (Yang et al., 2015c). Модели опухолей мыши оказали существенную поддержку в использовании в качестве мишеней многочисленных иммунных контрольных точек, в которых задействован ICOS во время роста опухоли (Leung and Suh, 2014). ICOS+ инфильтрация клеток коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациента, позволяя идентифицировать ICOS в качестве новой мишени противораковой иммунотерапии (Faget et al., 2013). ICOS может усиливать цитотоксическое воздействие индуцированных цитокинами киллерных клеток, направленных против холангиокарциномы как *in vitro*, так и *in vivo* (He et al., 2011).

Внутриопухолевая экспрессия IFNG, как было показано, ассоциируется с экспрессией молекул МНС II класса и более агрессивным фенотипом при меланомах человека (Brockner et al., 1988). Аутокринный сигналинг IFNG, как было показано в эксперименте, усиливает способность к метастазированию трансфицированных геном IFNG клеток аденокарциномы молочной железы, что связывалось с повышенной резистентностью к действию естественных киллерных клеток (NK) (Lollini et al., 1993).

Трижды негативный рак молочной железы имеет высокий уровень внутриопухолевой экспрессии IGFBP3, ассоциированного с маркерами неблагоприятного прогноза (Marzec et al., 2015). Был идентифицирован новый рецептор клеточной гибели, который специфически связывается с IGFBP3, и, возможно, может применяться в лечении рака молочной железы (Mohanraj and Oh, 2011). IGFBP3 демонстрирует свойства, способствующие выживаемости и росту *in vitro* (Johnson and Firth, 2014). IGFBP3 – это независимый маркер рецидивов уротелиальной клеточной карциномы (Phe et al., 2009).

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

IGFLR1 имеет мутации при колоректальном раке (Donnard et al., 2014). IGFLR1 имеет структурное сходство с семейством рецепторов фактора некроза опухоли (Lobito et al., 2011).

Белковая экспрессия IL411 очень часто наблюдается при опухолях. IL411 был обнаружен в опухолеассоциированных макрофагах различных видов опухолей, в неопластических клетках из лимфом и – в редких случаях – солидных раковых заболеваний, в основном, мезотелиом (Carbonnelle-Puscian et al., 2009). Повышение уровня IL411 в клетках Th17 человека ограничивает их экспансию, опосредованную Т-клеточным рецептором (ТКР), блокируя молекулярный сигнальный путь, задействованный в активации промотора ИЛ-2, и сохраняя высокий уровень Tob1, который препятствует началу клеточного цикла (Santarlasci et al., 2014).

IQGAP3 экспрессируется в избытке клетками рака легких и ассоциируется с ростом, миграцией и инвазией опухолевых клеток. Кроме того, его уровень повышен при амплификации

хромосом в гепатоклеточной карциноме, и уровень экспрессии IQGAP3 повышен у пациентов, больных колоректальным раком с p53-мутацией, с плохой выживаемостью (Katkooi et al., 2012; Yang et al., 2014b; Skawran et al., 2008). IQGAP3 модулирует сигнальный каскад EGFR/Ras/ERK и взаимодействует с Rac/Cdc42 (Yang et al., 2014b; Kunitomo et al., 2009).

Повышенные уровни ITGA2 были обнаружены в линиях клеток высоко инвазивной и метастатической меланомы по сравнению с культурами нормальных меланоцитов и клеточными линиями неметастатической меланомы (van Muijen et al., 1995). Уровень молекул клеточной адгезии ITGA2 был повышен за счет IFN-гамма, TNF-альфа и ИЛ-1-бета в клетках меланомы (Garbe and Krasagakis, 1993). Трансфекция ITGA2 в клетки рабдомиосаркомы человека, которые не экспрессируют ITGA2, усиливала частоту развития метастазов в различные органы (Matsuura et al., 1995).

KCNU1 локализован на хромосоме 8p на участке, который часто задействована в сложных хромосомных перестройках при раке молочной железы (Gelsi-Boyer et al., 2005). KCNU1 один из 25 наиболее часто экспрессируемых в избытке белков внеклеточной мембраны при гепатобластомах в образцах рака у пациентов детского возраста (Orentas et al., 2012).

Считается, что KIAA0226L является геном-супрессором опухоли, и он гиперметилирован при раке шейки матки. Повторная активация KIAA0226L ведет к снижению роста, жизнеспособности клеток и образования ими колоний (Huisman et al., 2015; Eijnsink et al., 2012; Huisman et al., 2013). Паттерны метилирования KIAA0226L могут использоваться для различения поражений, предшествующих заболеванию, и нормального рака шейки матки (Milutin et al., 2015). Паттерны метилирования KIAA0226L не могут использоваться как специфический биомаркер рака шейки матки (Sohrabi et al., 2014). Повторная активация KIAA0226L частично приводит к удалению метильных групп с его промоторного участка, а также снижает репрессивное метилирование гистонов (Huisman et al., 2013).

Избыточная экспрессия KIAA1244 является одним из важных механизмов, приводящих к активации сигнального пути эстрогенов/ЭР-альфа при гормон-зависимом росте клеток рака молочной железы (Kim et al., 2009). Ингибирование взаимодействия между KIAA1244 и RHB2 может стать новой терапевтической стратегией в лечении рака молочной железы люминального типа (Yoshimaru et al., 2013).

KIAA1524 кодирует раковый ингибитор протеинфосфатазы 2A (CIP2A). Важнейшая роль CIP2A была продемонстрирована, среди прочих, для НМЛР, ГКК, ПлККГШ, рака мочевого пузыря, поджелудочной железы, шейки матки, молочной железы, предстательной железы, яичника и колоректального рака (Ventela et al., 2015; Ma et al., 2014; Guo et al., 2015b; Rincon et al., 2015; Guo et al., 2015c; Wu et al., 2015; Peng et al., 2015; Lei et al., 2014; Liu et al., 2014c; Farrell et al., 2014; Fang et al., 2012; He et al., 2012; Bockelman et al., 2012).

Как было продемонстрировано, KIF18A избыточно экспрессируется при гепатоклеточном раке, что коррелировало со значимо более коротким периодом выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости. Таким образом, KIF18A может быть биомаркером для постановки диагноза гепатоклеточного рака и независимым предсказательным фактором выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости после хирургической резекции (Liao et al., 2014). Уровень экспрессии KIF18A повышен при специфических подвидах синовиальной саркомы (Przybyl et al., 2014). Экспрессию KIF18A при раке молочной железы сильно индуцирует эстроген, что ассоциируется с повышенной пролиферацией и снижением уровня апоптоза (Zou et al., 2014).

Избыточная экспрессия KIF20A была обнаружена при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы, меланоме, раке мочевого пузыря, немелкоклеточном раке легких и холангиоцеллюлярной карциноме (Imai et al., 2011; Yamashita et al., 2012; Stangel et al., 2015). Недавно сообщалось, что пациенты с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы, прошедшие вакцинацию полученным из KIF20A пептидом, имели лучший прогноз, чем контрольная группа (Asahara et al., 2013). Кроме того, сайленсинг KIF20A приводил к ингибированию пролиферации, подвижности и инвазии клеточных линий рака поджелудочной железы (Stangel et al., 2015).

Высокая экспрессия KIF26B при раке молочной железы ассоциируется с неблагоприятным прогнозом (Wang et al., 2013c). Повышенный уровень KIF26B имел значимую корреляцию с размером опухоли при анализе опухолевых тканей КРК и соответствующих образцов прилегающей нормальной слизистой оболочки. KIF26B играет важную роль в онкогенезе колоректальных опухолей и действует как новый прогностический фактор и потенциальная терапевтическая мишень при КРК (Wang et al., 2015d).

Как было продемонстрировано, KIF2C участвует в направленной миграции и инвазии опухолевых клеток (Ritter et al., 2015). Избыточная экспрессия KIF2C, как было показано, ассоциируется с инвазией лимфатических узлов и метастазами в лимфатические узлы у пациентов с раком желудка и колоректальным раком (Ritter et al., 2015). Было продемонстрировано, что уровень KIF2C повышен при раке тела языка (Wang et al., 2014a). Высокий уровень экспрессии KIF2C, как было показано, ассоциируется с метастазами в лимфатические узлы и стадией опухоли при плоскоклеточной карциноме тела языка (Wang et al., 2014a). Сайленсинг KIF2C, как было показано, приводит к подавлению пролиферации и миграции линии клеток Tca8113 плоскоклеточной карциномы полости рта человека (Wang et al., 2014a). Сообщалось, что мутация KIF2C ассоциируется с колоректальным раком (Kumar et al., 2013).

Было продемонстрировано, что KIFC1 необходим для правильной сборки веретена деления, устойчивого скопления на полюсах деления и выживаемости раковых клеток вне зависимости от числа образованных centrosом (нормальных или добавочных centrosом). Было продемонстрировано, что уровень экспрессии KIFC1 повышен при раке молочной железы, в особенности при эстроген-рецептор негативном, прогестерон-рецептор негативном и трижды негативном раке молочной железы и в 8 клеточных линиях рака молочной железы человека. В клетках эстроген-рецептор-позитивного рака молочной железы KIFC1 является одним из 19 других кинезинов, экспрессию которых сильно индуцирует эстроген. При раке молочной железы избыточная экспрессия KIFC1 и его накопление в ядре, как было показано, коррелирует с гистологической степенью злокачественности и позволяет предвидеть низкую выживаемость без прогрессирования заболевания и общую выживаемость. Было продемонстрировано, что в линиях клеток рака молочной железы избыточная экспрессия KIFC1 опосредует резистентность к доцетакселу. Сайленсинг KIFC1 отрицательно влияет на жизнеспособность клеток рака молочной железы (Zou et al., 2014; Pannu et al., 2015; De et al., 2009; Li et al., 2015b). Было показано, что KIFC1 экспрессируется в избытке при раке яичника, что ассоциируется с агрессивностью опухоли, высокой степенью злокачественности и поздними стадиями опухоли. KIFC1 был идентифицирован как один из трех генов, высокие уровни экспрессии которых в первичных опухолях НМРЛ указывают на более высокий риск развития метастазов в головной мозг (Grinberg-Rashi et al., 2009).

KL описывали в качестве гена-супрессора опухоли, который подавляет эпителиально-мезенхимальный переход при раке шейки матки, и который выполняет функцию гена-супрессора опухоли при нескольких видах рака человека, ингибируя сигнальные пути инсулин/IGF1, p53/p21 и Wnt (Xie et al., 2013; Qureshi et al., 2015). KL описывали как ген, aberrантно экспрессирующийся при ряде раковых заболеваний, включая рак молочной железы, рак легких и гепатоклеточную карциному (Zhou and Wang, 2015). Уровень KL, как было описано, снижен при раке поджелудочной железы, гепатоклеточной карциноме и других опухолях (Zhou and Wang, 2015). KL описывали как новый биомаркер рака, снижение уровня которого, как было описано, приводит к стимуляции пролиферации и снижению апоптоза в раковых клетках. В данном контексте сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенина является одним из нескольких сигнальных путей, имеющих к этому отношение (Zhou and Wang, 2015). Полиморфизм гена KL, как было продемонстрировано, ассоциируется с повышенным риском заболевания колоректальным раком (Liu et al., 2015).

KLHDC7B ассоциируется с плоскоклеточной карциномой шейки матки и является потенциальным биомаркером плоскоклеточной карциномы шейки матки (Guo et al., 2015a).

Гены KLHL отвечают за развитие нескольких моногенных (Менделевских) болезней и ассоциируются с раком (Dhanao et al., 2013).

Фокальная экспрессия KRT31 наблюдалась при инвазивной онихоцитной карциноме, образовавшейся из кератиноцитов матрицы ногтя (Wang et al., 2015e). Пиломатрикомы – это опухоли, которые способствуют дифференциации клеток матрицы волосяного фолликула, демонстрируя дифференциацию в направлении придатков кожи с последующей избыточной экспрессией кератинов KRT35 и KRT31 (Battistella et al., 2014).

KRT35 был одним из наиболее часто и сильно экспрессирующихся кератинов волос в пиломатрикомах. Пиломатрикомы – это опухоли, которые способствуют дифференциации клеток матрицы волосяного фолликула, демонстрируя дифференциацию в направлении придатков кожи с последующей избыточной экспрессией кератинов KRT35 и KRT31 (Battistella et al., 2014).

Нокдаун LCTL позволяет hTERT иммортализовать эпителиальные клетки толстой кишки человека (Kim et al., 2011).

Согласно наблюдениям исследователей ингибирование экспрессии LRBA за счет РНК-интерференции или доминантно-негативными мутантами приводило к ингибированию роста раковых клеток. Эти свидетельства позволяют предположить, что нарушение регуляции экспрессии LRBA вносит свой вклад в изменение ростовых свойств раковых клеток (Wang et al., 2004).

LRRC8E экспрессируется в избытке в тканях остеосаркомы и нейробластомы по сравнению с нормальными образцами (Orentas et al., 2012).

Полиморфизмы LTA вносят свой вклад в повышение риска развития рака (Huang et al., 2013a). Такие факторы резорбции костной ткани, как LTA, вырабатываются определенными видами солидных и гематологических раковых опухолей и участвуют в вызванной опухолью гиперкальциемии (Goni and Tolis, 1993). Существует связь между сигнальной осью от LTA к LTbetaR и раком (Drutskaya et al., 2010). Образованный из В-клеток лимфотоксин способствует развитию кастрационно-резистентного рака предстательной железы (Ammirante et al., 2010).

MACC1 экспрессируется в избытке во многих видах раковых опухолей, включая рак желудка, колоректальный рак, рак легких и молочной железы, и ассоциируется с прогрессированием рака, метастазированием и плохой выживаемостью пациентов (Huang et al., 2013b; Ma et al., 2013a; Stein, 2013; Wang et al., 2015b; Wang et al., 2015h; Ilm et al., 2015). MACC1 стимулирует канцерогенез за счет использования в качестве мишени сигнальных путей бета-катенина и R3K/AKT, что приводит к повышению уровня c-Met и бета-катенина и их генов-мишеней по ходу транскрипции, включая c-Myc, циклин D1, caspase9, BAD и MMP9 (Zhen et al., 2014; Yao et al., 2015).

MAGEA10 кодирует члена A10 семейства MAGE, причастного к развитию некоторых наследственных заболеваний, таких как врожденный дискератоз (RefSeq, 2002). С помощью вакцины, направленной на MAGEA10 и два других раково-тестикулярных антигена, о которых известно, что все они являются мишенями ответов цитотоксических Т-лимфоцитов, могут быть охвачены более чем две трети раковых заболеваний молочной железы (Taylor et al., 2007). MAGEA10 экспрессировался в 36,7% опухолевых тканей пациентов с гепатоклеточной

карциномой; тем не менее, он не экспрессировался в парараковых тканях (Chen et al., 2003). MAGEA10 экспрессировался в 14% из 79 тканей рака легких (Kim et al., 2012).

MAGEB6 был идентифицирован как новый ген MAGE, не экспрессирующийся в нормальных тканях, за исключением семенника, и экспрессирующийся в опухолях различного гистологического происхождения (Lucas et al., 2000). MAGEB6, как было обнаружено, часто экспрессируется при плоскоклеточной карциноме головы и шеи, а позитивность по мРНК указывает на значимую связь с признанными клиническими характеристиками неблагоприятного исхода (Zamuner et al., 2015).

MCC взаимодействует с бета-катенином и повторная экспрессия MCC клетками колоректального рака специфично ингибирует сигнальный путь Wnt (Fukuyama et al., 2008). Ген MCC имеет тесную взаимосвязь с геном предрасположенности к аденоматозному полипозу толстой кишки на хромосоме 5, участке с частыми потерями гетерозиготности (LOH) при колоректальном раке (Kohonen-Corish et al., 2007). Потеря гетерозиготности гена MCC обнаруживалась как на ранних, так и на поздних стадиях рака желудка, легких, пищевода и молочной железы (Wang et al., 1999a; Medeiros et al., 1994).

Как было продемонстрировано, уровень MET повышен при дедифференцированной липосаркоме и ассоциируется с меланоцитарными опухолями, гепатоклеточной карциномой, немелкоклеточным раком легких, наследственными видами папиллярного рака почки и аденокарциномами желудка (Petrini, 2015; Finocchiaro et al., 2015; Steinway et al., 2015; Bill et al., 2015; Yeh et al., 2015).

Экспрессия MMP10 при плоскоклеточной карциноме полости рта была интенсивной и при веррукозной карциноме – умеренной (Kadeh et al., 2015). MMP10 содействует гепатокарциногенезу в новом перекрестном взаимодействии с образованной из клеток стромы осью фактор1/рецептор 4 C-X-C-хемокинов (Garcia-Irigoyen et al., 2015). Инфекция *Helicobacter pylori* способствует инвазии и метастазированию рака желудка за счет повышения экспрессии MMP10 (Jiang et al., 2014a). MMP10 стимулирует прогрессирование опухоли, регулируя ангиогенный и апоптотический сигнальные пути при опухолях шейки матки (Zhang et al., 2014).

Повышенный уровень MMP-13 до операции, как было установлено, ассоциируется с прогрессирующим опухолью и плохой выживаемостью у пациентов с плоскоклеточной карциномой пищевода (Jiao et al., 2014). PAI-1, ген-мишень miR-143, регулирует инвазию и метастазирование в легкие за счет усиления экспрессии MMP-13 и секреции в клетках остеосаркомы человека, позволяя предположить, что эти молекулы могут быть потенциальными генами-мишенями при терапии, направленной на предупреждение метастазов в легкие у пациентов с остеосаркомами (Hirahata et al., 2016). Уровень MMP13 уже повышен при красном плоском лишае полости рта (OLP), который был классифицирован как предраковое состояние, предшествующее плоскоклеточной карциноме полости рта (ПлККПР) (Agha-Hosseini and Mirzaii-Dizgah, 2015). MMP-13 играет потенциально уникальную физиологическую роль в регенерации клеток, подобных остеобластам (Ozeki et al., 2016).

Регуляция уровня MUC5AC нарушена при различных видах рака, включая колоректальный рак, рак желудка, легких и поджелудочной железы. Истощение или низкий уровень экспрессии при колоректальных и желудочных опухолях ассоциируется с более агрессивным поведением и неблагоприятным прогнозом. Избыточная экспрессия при раке легких приводит к росту вероятности развития рецидива и метастазов (Yonezawa et al., 1999; Kocer et al., 2002; Kim et al., 2014b; Yu et al., 1996).

MUC5B избыточно экспрессируется в различных видах рака, включая колоректальный рак, рак легких и молочной железы и ассоциируется с прогрессирующим опухолью (Sonora et al., 2006; Valque et al., 2012; Walsh et al., 2013; Nagashio et al., 2015). Экспрессия MUC5B может быть подавлена под влиянием метилирования, и его уровень может быть повышен за счет ATF-1, c-Myc, NFκappaB, Sp1, CREB, TTF-11 и GCR (Perrais et al., 2001; Van, I et al., 2000).

О генетических вариантах MUC6 сообщалось, что они модифицируют риск развития рака желудка (Resende et al., 2011). При опухолях слюнной железы профили экспрессии MUC6, вероятно, тесно коррелируют с гистопатологическим видом опухоли, что указывает на возможность их применения в целях улучшения точности диагностики (Mahomed, 2011). В исследованиях было установлено различие экспрессии MUC6 в тканях рака молочной железы и в неопухолевых тканях молочной железы (Mukhopadhyay et al., 2011).

Китайское клиническое исследование идентифицировало MXRA5 в качестве второго наиболее часто подвергающегося мутации гена при немелкоклеточном раке легких (Xiong et al., 2012). Как было показано, MXRA5 избыточно экспрессируется при раке толстой кишки и мог бы служить в качестве биомаркера для постановки диагноза на ранних стадиях и метастазов в сальнике (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

За счет нескольких мутаций MYB может быть превращен в онкогенный трансформирующий белок (Zhou and Ness, 2011). MYB известен как онкоген и ассоциируется с апоптозом, контролем клеточного цикла, ростом клетки/ангиогенезом и клеточной адгезией за счет регуляции экспрессии ключевых генов-мишеней, таких как циклооксигеназа-2, Bcl-2, BclX(L) и c-Myc (Ramsay et al., 2003; Stenman et al., 2010). Онкогенный слитый белок MYB-NFIB и избыточная экспрессия MYB были обнаружены при аденокистозной карциноме слюнной железы и молочной железы, диффузных глиомах у детей, остром миелолейкозе и раке поджелудочной железы (Wallrapp et al., 1999; Pattabiraman and Gonda, 2013; Nobusawa et al., 2014; Chae et al., 2015; Marchio et al., 2010). При синергизме между MYB и бета-катенином в сигнальном пути Wnt, MYB ассоциируется с онкогенезом толстой кишки (Burgess et al., 2011). Поскольку MYB является прямой мишенью эстрогенового сигналинга, терапия, направленная на MYB, предусмотрена для ЭР-положительных опухолей молочной железы (Gonda et al., 2008).

N4BP2 играет потенциальную роль в развитии назофарингеальной карциномы. Имеется статистически значимое различие между двумя различными блоками гаплотипов, которые коррелируют с риском возникновения спорадической назофарингеальной карциномы. Кроме того, N4BP2 избыточно экспрессируется в тканях этой опухоли по сравнению с аналогичными нормальными тканями (Zheng et al., 2007).

В ходе многоэтапного клинического исследования только на больных с полногеномным поиском ассоциаций для 12 518 случаев рака предстательной железы, NAALADL2 был идентифицирован как локус, ассоциированный с баллами по Глисон, шкалой агрессивности заболевания по патологическим признакам (Berndt et al., 2015). NAALADL2 избыточно экспрессируется при раке предстательной железы и толстой кишки и стимулирует развитие фенотипа, способствующего миграции и метастазированию, ассоциирующегося с плохой выживаемостью (Whitaker et al., 2014).

Уровень NCAPG понижен у пациентов с множественной миеломой, острым миелолейкозом и в лейкозных клетках из крови или клетках миеломы (Cohen et al., 2014). NCAPG может быть геном мультилекарственной резистентности при колоректальном раке (Li et al., 2012a). Уровень NCAPG в высокой степени повышен при хромофобной форме клеточной карциномы человека, но не при обычной почечноклеточной карциноме человека (Kim et al., 2010a). Высокие уровни экспрессии NCAPG ассоциируются с прогрессированием меланомы (Ryu et al., 2007). NCAPG ассоциируется с увеальной меланомой (Van Ginkel et al., 1998). NCAPG демонстрирует различные уровни экспрессии в различных опухолевых клетках (Jager et al., 2000).

NRK кодирует Nik-связанную киназу, протеинкиназу, необходимую для активации JNK, которая может быть задействована в индукции полимеризации актина на поздней стадии эмбриогенеза (RefSeq, 2002). NRK активирует сигнальный путь c-Jun N-терминальной киназы и может участвовать в регуляции организации актинового цитоскелета в клетках скелетных мышц за счет фосфорилирования кофилина (Nakano et al., 2003).

NUP210, как было продемонстрировано, является геном-кандидатом, имеющим полиморфизмы, ассоциирующиеся с риском возникновения колоректального рака (Landi et al., 2012). Как было показано, уровень NUP210 повышен при раке шейки матки и, как предполагается, он играет роль на ранней фазе онкогенеза (Rajkumar et al., 2011).

Было продемонстрировано, что ORC1 экспрессируется в избытке в полученных из опухоли линиях клеток, и согласно предположению он является биомаркером рака предстательной железы, а также лейкоза (Struyf et al., 2003; Zimmerman et al., 2013; Young et al., 2014). За счет своих взаимодействий с гистонацетилтрансферазами, такими как HBO1, ORC1 выполняет онкогенные функции при раке молочной железы (Wang et al., 2010).

Отсутствие гетерозиготных мутаций в двух однонуклеотидных полиморфизмах в OSCP1 может быть биомаркером восприимчивости к невирусной карциноме печени (Toda et al., 2014).

OVOL2 индуцирует мезенхимально-эпителиальный переход, приводя к снижению метастазирования (Roca et al., 2013). OVOL2 ингибирует c-Мyc и Notch1 (Wells et al., 2009).

OVOL2 гиперметилован при колоректальном раке, приводя к его неспособности ингибировать сигнальный путь Wnt (Ye et al., 2016). Избыточная экспрессия OVOL2 ослабляла миграцию и инвазию клеток, снижала количество маркеров мезенхимально-эпителиального перехода и подавляла метастазирование (Ye et al., 2016). Уровень OVOL2 снижен при колоректальном раке и обратно коррелирует со стадией опухоли (Ye et al., 2016). OVOL2 регулируется сигнальным путем Wnt (Ye et al., 2016).

OXR1 значимо экспрессируется в избытке в первичных опухолях тонкой кишки и нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы, мелкоклеточной карциноме легких, карциноме яичника, а также при раке предстательной железы, опосредуя миграцию клеток и развитие метастазов (Morita et al., 2004; Zhong et al., 2010; Carr et al., 2012; Carr et al., 2013; Requeux et al., 2002). Тем не менее, OXR1 также оказывает ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток новообразований, возникших как из эпителия, так и нервной или костной ткани, что, как считается, зависит от расположения рецептора на мембране (Cassoni et al., 2004).

PAPPA представляет ген, связанный с метастазированием, встречающийся при различных видах рака, таких как НМРЛ и гепатоклеточная карцинома, где он положительно ассоциируется с факторами роста (VEGF и IGF-1) и транскрипции (NF-каппаВ p50, NF-каппаВ p65, HIF-1альфа) (Salim et al., 2013; Iunusova et al., 2013; Engelmann et al., 2015). PAPPA регулирует прохождение фазы митоза за счет модулирования сигнального пути IGF-1 в клетках рака молочной железы и яичника, где он преимущественно обнаруживается в первичном очаге (Boldt and Conover, 2011; Loddo et al., 2014; Becker et al., 2015; Iunusova et al., 2014).

Уровень PGAP1 снижен в линии клеток AsPC-1 аденокарциномы (Yang et al., 2016).

PGR ассоциируется в высокой степени с инициацией и прогрессированием рака молочной железы, при котором он активирует сигнальные пути MAPK и PI3K/АКТ, а также экспрессию рецепторов фактора роста (GFR) (Jaiswal et al., 2014; Piasecka et al., 2015). PGR (помимо HER и рецептора эстрогенов) выступает в роли фактора классификации, помогая выделять три различных подтипа рака молочной железы (Safarpour and Tavassoli, 2015).

PLA2G7 оказывает сильное воздействие на метаболизм жиров в клетках рака молочной железы, яичника, меланомы и рака предстательной железы, где блокировка фермента приводит к сниженной патогенности рака (Vainio et al., 2011a; Massoner et al., 2013; Kohnz et al., 2015). PLA2G7 ассоциируется в высокой степени с раком предстательной железы и, таким образом, представляет собой потенциальный биомаркер этого вида рака (Vainio et al., 2011b).

Уровень PPP3R1 повышен в клетках гепатоклеточной карциномы, оказывая влияние на вплоть до 10 различных сигнальных путей (Zekri et al., 2008).

PRKDC – это ген, часто подвергающийся мутации при раке яичника, ассоциированным с эндометриозом, и раке молочной железы (Er et al., 2016; Wheler et al., 2015). Уровень PRKDC повышен в раковых тканях по сравнению с нормальными тканями при колоректальной карциноме. Пациенты с высокими уровнями экспрессии PRKDC демонстрируют худшую общую выживаемость (Sun et al., 2016).

Повышенный уровень экспрессии PSMA7T был обнаружен при метастатическом раке легких, кастрационно-рекуррентном раке предстательной железы (КРПЖ), а также при первичном колоректальном раке, при котором он повышает риск метастазов в печень (Hu et al., 2008; Hu et al., 2009; Romanuik et al., 2010; Cai et al., 2010). Также было показано, что количество PSMA7T коррелирует с трансактивацией андрогенного рецептора (AR) в условиях андроген-/AR-опосредованного роста опухоли предстательной железы (Ogiso et al., 2002).

Было показано, что PSMC1 способен оказывать влияние на рост клеток и, таким образом, он представляет собой потенциальную мишень противораковой терапии в клетках рака предстательной железы, множественной миеломы и глиобластомы (Dahlman et al., 2012; Kim et al., 2008).

RAD18 задействован в онкогенезе в связи с его хорошо известной способностью к синтезу ДНК в обход повреждения, пост-репликационной репарации и гомологичной рекомбинации ДНК (Ting et al., 2010). Полиморфизм Arg302Gln гена RAD18 ассоциируется с риском развития колоректального рака и немелкоклеточного рака легких (Kanzaki et al., 2008; Kanzaki et al., 2007). RAD18 опосредует развитие устойчивости клеток глиомы человека к ионизирующему излучению, и нокдаун RAD18 нарушает репарацию, опосредованную гомологичной

рекомбинацией, приводя к повышенному накоплению двухнитевых разрывов (Xie et al., 2014). При использовании тканевой микроматрицы меланомы было продемонстрировано, что уровень ядерной экспрессии RAD18 был повышен при первичной и метастатической меланоме в сравнении с диспластическими невусами (Wong et al., 2012).

Как было продемонстрировано, RAD51AP1 ассоциируется с папиллярным раком щитовидной железы вследствие лучевой нагрузки (Handkiewicz-Junak et al., 2016). Амплификация RAD51AP1, как было показано, коррелирует с иммортализацией клеток и более коротким периодом выживаемости при раке яичника (Sankaranarayanan et al., 2015). Сообщалось, что RAD51AP1 часто избыточно экспрессируется в опухолевых клетках и тканях, и нарушение функции RAD51AP1, как предполагается, является многообещающим подходом в таргетной терапии опухоли (Parplys et al., 2014). Транскрипция RAD51AP1, как было показано, напрямую стимулируется геном-супрессором опухоли MEN1 (Fang et al., 2013). Как было показано, уровень RAD51AP1 повышен при внутривенной холангиокарциноме, папиллома-вирус-положительной плоскоклеточной карциноме головы и шеи человека и при опухолях молочной железы с дефицитом BRCA1 по сравнению со спорадическими опухолями молочной железы (Martinez et al., 2007; Martin et al., 2007; Obama et al., 2008). Супрессия RAD51AP1, как было показано, приводит к подавлению роста клеток внутривенной холангиокарциномы, что предполагает его участие в развитии и/или прогрессировании внутривенной холангиокарциномы (Obama et al., 2008).

Нокдаун RBM14, как было показано, блокирует повторный рост мультиформной глиобластомы после облучения *in vivo* (Yuan et al., 2014). Пониженный уровень RBM14, как было показано, наблюдается при почечноклеточной карциноме (Kang et al., 2008). RBM14 описывали как потенциальный ген-супрессор опухоли при карциноме почки, который ингибирует переход от G1 к S-фазе клеточного цикла в клетках почки человека и подавляет свободный [«безъякорный»] рост и образование опухоли из ксенотрансплантата отчасти за счет снижения уровня протоонкогена c-мус (Kang et al., 2008). Было продемонстрировано, что RBM14 участвует в воздействии PEА3 и MCF7, усиливающим миграцию, в раковых клетках человека (Verreman et al., 2011). Ген RBM14, как было показано, амплифицирован в ряде первичных раковых заболеваний человека, включая немелкоклеточную карциному легких, плоскоклеточную карциному кожи и лимфому (Sui et al., 2007).

RBM4 участвует в механизмах, регулирующих сплайсинг предшественника мРНК, подавляя пролиферацию и миграцию различных раковых клеток (Lin et al., 2014; Wang et al., 2014c). Нарушение регуляции активности RBM4 было обнаружено при раке шейки матки, молочной железы, легких, толстой кишки, яичника и прямой кишки (Liang et al., 2015; Markus et al., 2016).

Уровни RCOR3 в сыворотке пациентов, больных раком печени, были значительно ниже, чем у пациентов с умеренной формой хронического гепатита В и мягкой формой хронического гепатита В (Xue et al., 2011).

Снижение уровня RFWD2 коррелирует с неблагоприятным прогнозом при раке желудка (Sawada et al., 2013). RFWD2 напрямую взаимодействует с p27, и нарушение регуляции этого взаимодействия причастно к онкогенезу (Choi et al., 2015b; Choi et al., 2015a; Marine, 2012). Повышение уровня RFWD2 коррелирует с неблагоприятным прогнозом при раке мочевого пузыря, раке желудка и трижды негативном раке молочной железы (Ouyang et al., 2015; Li et al., 2016; Li et al., 2012c).

RIF1 экспрессируется в высокой степени в опухолях молочной железы человека, кодирует антиапоптотический фактор, требуемый для репарации ДНК, и является потенциальной мишенью в лечении рака (Wang et al., 2009a). Роль RIF1 в сохранении целостности генома была дополнена функцией регуляции хроматиновых структур, репликационным таймингом и контрольной точкой в S-фазе (Kumar and Cheok, 2014).

У пациентов с диагнозом инфантильный висцеральный мультицентричный миофиброматоз были идентифицированы новые гомозиготные варианты гена RLTPR (Linhares et al., 2014).

Уровень RNF24, как было показано, повышен при аденокарциноме пищевода и играет важнейшую роль в прогрессировании синдрома Баррета в аденокарциному пищевода (Wang et al., 2014b). RNF24, как было показано, дифференциально экспрессируется в зависимости от определенных факторов риска при плоскоклеточной карциноме полости рта (Cheong et al., 2009).

RPGRIP1L подавляет свободный [«безъякорный»] рост отчасти за счет белка митотической контрольной точки Mad2 и является кандидатом в гены-супрессоры опухоли при гепатоклеточной карциноме человека (Lin et al., 2009).

Избыточная экспрессия Rtl1 в печени взрослых мышей приводит к образованию опухолей с высокой пенетрантностью, и избыточная экспрессия RTL1 была обнаружена в 30% проанализированных образцов гепатоклеточной карциномы человека (Riordan et al., 2013). Транскрипционная активность импринтингового гена RTL1 оценивали в панели образцов 32 опухолей Вильмса, и была обнаружена масштабная избыточная экспрессия в сравнении с нормальной тканью почки (Hubertus et al., 2011).

SAPCD2 (также называемый p42.3 или C9orf140) кодирует белок, экспрессия которого была первоначально обнаружена при раке желудка, но не в нормальной слизистой оболочке желудка (Xu et al., 2007). SAPCD2 избыточно экспрессируется в различных видах рака, включая колоректальный рак, рак желудка, гепатоклеточный рак и рак головного мозга, и высокие уровни SAPCD2 ассоциируются с прогрессированием опухоли (Sun et al., 2013; Weng et al., 2014; Wan et al., 2014). Оптимальный сигнальный путь гена SAPCD2 в сети регуляторных белков при раке желудка включает белок Ras, белок Raf-1, MEK, киназу MAPK, MAPK, тубулин, белок веретена деления, центромерный белок и опухоль (Zhang et al., 2012a; Weng et al., 2014).

Более низкий уровень экспрессии SEMA3A, как было показано, коррелирует с более коротким периодом общей выживаемости и обладает независимой прогностической значимостью для пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи (Wang et al., 2016). Избыточная экспрессия SEMA3A, как было показано, подавляет миграцию, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход отчасти в связи с ингибированием NF- $\kappa$ B и SNAI2 в клеточных линиях плоскоклеточной карциномы головы и шеи (Wang et al., 2016). Таким образом, SEMA3A служит геном-супрессором опухоли при плоскоклеточной карциноме головы и шеи и может быть новой мишенью в лечении этого заболевания (Wang et al., 2016). Экспрессия SEMA3A, как было продемонстрировано, значимо обратно ассоциируется с метастазами при гепатоклеточной карциноме (Yan-Chun et al., 2015). Сообщалось, что уровень SEMA3A снижен при многочисленных видах рака, включая рак предстательной железы, рак молочной железы, глиому, эпителиальную карциному яичника и рак желудка (Jiang et al., 2015a; Tang et al., 2014).

Низкая экспрессия SEMA3A, как было показано, коррелирует с низкой степенью дифференциации, инвазией сосудов, глубиной инвазии, метастазами в лимфатические узлы, отдаленными метастазами, более поздней стадией опухоли по TNM и неблагоприятным прогнозом при раке желудка (Tang et al., 2014). SEMA3A описывали в качестве кандидата в гены-супрессоры опухоли и потенциального прогностического биомаркера канцерогенеза желудка (Tang et al., 2014).

Было продемонстрировано, что миссенс-варианты гена SERPINB10 имеют онкогенные свойства, увеличивая риск возникновения рака предстательной железы (Shioji et al., 2005). Кроме того, уровень экспрессии SERPINB10 существенно повышен при метастатических опухолях молочной железы (Klopfleisch et al., 2010).

Уровень экспрессии SLC16A14 значимо ассоциируется с выживаемостью без прогрессирования заболевания и представляет собой новый предполагаемый маркер прогрессирования эпителиального рака яичника (Elsnerova et al., 2016).

SLC18A1 демонстрировал низкую экспрессию при неблагоприятных формах нейробластомы по сравнению с благоприятными (Wilzen et al., 2009).

SLC25A43 был идентифицирован как регулятор хода клеточного цикла и пролиферации за счет предполагаемой митохондриальной контрольной точки в клеточных линиях рака молочной железы (Gabrielson et al., 2016). SLC25A43 влияет на эффективность лекарственных препаратов и регуляцию клеточного цикла вследствие воздействия лекарственным препаратом на клеточные линии рака молочной железы (Gabrielson and Tina, 2013).

Уровень SLC28A3, как было показано, понижен при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013). SLC28A3 ассоциируется с клиническим исходом при метастатическом раке молочной железы после химиотерапии препаратами паклитаксел и гемцитабин, общей выживаемостью после лечения гемцитабином немелкоклеточного рака легких и общей выживаемостью после радиохимиотерапии на основе гемцитабина аденокарциномы поджелудочной железы (Li et al., 2012b; Lee et al., 2014b; Marechal et al., 2009). SLC28A3 ассоциируется с резистентностью к флударабину при

хроническом лимфоцитарном лейкозе и лекарственной резистентностью при Т-клеточном лейкозе (Karim et al., 2011; Fernandez-Calotti et al., 2012).

Уровень SLC2A13 был устойчиво повышенным в сферообразующих клетках из первичных культур образцов плоскоклеточной карциномы полости рта, и конфокальная микроскопия выявила, что клетки, экспрессирующие SLC2A13, были внедрены в ограниченные участки опухолевой ткани в виде кластера, позволяя предположить, что SLC2A13 может быть потенциальным маркером раковых стволовых клеток (Lee et al., 2011). SLC2A13 был идентифицирован как ген, ассоциированный со стимуляцией и прогрессированием немелкоклеточного рака легких (Bankovic et al., 2010).

Ингибирование SLC35A1, как было показано, уменьшает сиалирование раковых клеток и снижает метастатический потенциал раковых клеток (Maggioni et al., 2014).

Уровень SLC7A11, как было показано, понижен в вариантах линии клеток W1 рака яичника с лекарственной резистентностью, и, таким образом, он может играть роль в развитии лекарственной резистентности в раковых клетках (Januchowski et al., 2013). Описывалось, что SLC7A11 модулирует микроокружение опухоли, создавая благоприятные условия для роста раковой опухоли (Savaskan and Eypoglu, 2010). Сообщалось, что SLC7A11 задействован в нейродегенеративных процессах в глиомах (Savaskan et al., 2015). SLC7A11, как было показано, подавляется p53 в контексте ферроптоза. Описывалось, что ось p53-SLC7A11 сохраняется в мутантном варианте p53(3KR) и содействует его способности подавлять онкогенез в отсутствие классических механизмов подавления опухоли (Jiang et al., 2015b). SLC7A11 описывался как функциональная субъединица системы Xc-, функциональность которой повышена в клетках агрессивного рака молочной железы (Linher-Melville et al., 2015). Высокая степень окрашивания клеточных мембран SLC7A11 при резистентном к цисплатину раке мочевого пузыря, как было показано, ассоциируется с худшим клиническим исходом, и ингибирование SLC7A11 описывалось как многообещающий терапевтический подход в лечении этого заболевания (Drayton et al., 2014). SLC7A11, как было продемонстрировано, дифференциально экспрессируется в линии клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека, подвергавшейся воздействию бензола и его метаболитов, и, таким образом, подчеркивает потенциальную ассоциацию SLC7A11 с лейкогенезом (Sarma et al., 2011). Описывалось, что повреждение SLC7A11 приводит к ингибированию роста различных

карцином, включая лимфому, глиому, рак предстательной железы и молочной железы (Chen et al., 2009). Ингибирование SLC7A11, как было продемонстрировано, ингибирует клеточную инвазию в линии клеток KYSE150 рака пищевода *in vitro* и его метастазирование в эксперименте с голыми мышами, и таким образом, это подтверждает роль SLC7A11 в метастазировании опухоли (Chen et al., 2009).

SLCO5A1 локализован на плазматической мембране и может вносить свой вклад в развитие химиорезистентности мелкоклеточной карциномы легких, оказывая воздействия на внутриклеточный транспорт лекарственных средств (Olszewski-Hamilton et al., 2011). SLCO5A1 – это наиболее известный полипептид-транспортер органических анионов при метастатическом мелкоклеточном раке легких, и уровень мРНК SLCO5A1 очень сильно повышен при опухолях печени и раке молочной железы (Kindla et al., 2011; Wlcek et al., 2011; Brenner et al., 2015). Слияния генов при плоскоклеточной карциноме ротоглотки ассоциируются со снижением уровня SLCO5A1 (Guo et al., 2016).

Уровень SP5 был снижен после истощения бета-катенина в клеточных линиях рака колоректального рака, и SP5 является новой непосредственной нисходящей мишенью в сигнальном пути Wnt (Takahashi et al., 2005). Избыточная экспрессия SP5 демонстрировала активацию сигнального пути бета-катенина при редких новообразованиях поджелудочной железы человека (Cavard et al., 2009). В клетках колоректальной карциномы человека, демонстрирующих нарушение сигнального пути Wnt, монезин снижал внутриклеточные уровни  $\beta$ -катенина, приводя к снижению уровня экспрессии генов-мишеней сигнального пути Wnt, таких как SP5, и уменьшению скорости пролиферации клеток (Tumova et al., 2014).

В 15 аденокортикальных аденомах, вырабатывающих кортизол, STIL находится среди генов с изменениями числа копий и потерей гетерозиготности с копий-нейтральным характером (Ronchi et al., 2012). Делеции хромосом, приводящие к слиянию этого гена и прилегающего локуса, обычно встречаются при Т-клеточном лейкозе, и считается, что они возникают из-за явлений незаконной рекомбинации V-(D)-J (Karrman et al., 2009; Alonso et al., 2012).

Повышенный уровень экспрессии TBC1D7 был обнаружен в большинстве раковых опухолей легких, и иммуногистохимическое окрашивание позволяет предположить наличие ассоциации экспрессии TBC1D7 с неблагоприятным прогнозом для пациентов с НМРЛ (Sato et al., 2010).

Избыточная экспрессия TBC7 усиливала убиквитинирование TSC1 и увеличивала фосфорилирование белка S6 за счет киназы S6, которая является участником сигнального пути mTOR (Nakashima et al., 2007).

TDG оказывает воздействие на сигнальный путь Wnt, стимулируя его за счет взаимодействия с фактором транскрипции TCF4, и он считается потенциальным биомаркером колоректального рака (Xu et al., 2014). С другой стороны, низкая экспрессия TDG ведет к нарушению сигнального пути эксцизионной репарации оснований (BER) с сильными онкогенными чертами (van de Klundert et al., 2012). Снижение уровня этого белка наблюдалось на ранних стадиях рака молочной железы, плоскоклеточной карциномы пищевода (ПлККП), а также при раке желудка (Li et al., 2013; Du et al., 2015; Yang et al., 2015a).

Среди четырех наиболее часто подвергающегося мутации генов TENM4 демонстрировал мутации с изменениями белков при первичных лимфомах ЦНС (Vater et al., 2015). Клеточная линия MDA-MB-175 содержит хромосомную транслокацию, которая приводит к слиянию TENM4 и рецепторов семейства ErbB. Химерные гены были также обнаружены при нейробластомах (Wang et al., 1999b; Voeva et al., 2013).

TET2 является важнейшим регулятором гомеостаза кроветворных стволовых клеток, нарушения функций которых ведут к развитию злокачественных заболеваний кроветворной системы (Nakajima and Kunimoto, 2014). Мутации TET2 оказывают негативное влияние на прогноз и могут помочь обосновать терапевтические стратегии на основе оценки риска для пациентов с острым миелолейкозом (Liu et al., 2014b). Ядерная локализация TET2 утрачена в значительной части тканей колоректального рака, ассоциируясь с метастазами (Huang et al., 2016).

TKTL1 ассоциируется с развитием и прогрессированием многих видов опухолей, таких как плоскоклеточная карцинома пищевода, плоскоклеточная карцинома полости рта, рак легких, колоректальный рак и немелкоклеточный рак легких (Kayser et al., 2011; Bentz et al., 2013; Grimm et al., 2014).

TMEM67 выполняет функции в процессе миграции центриолей к апикальной мембране и образования первичных цилий. Дефекты этого гена являются причиной синдрома Меккеля 3

типа (MKS3) и синдрома Жубера 6 типа (JBTS6) (RefSeq, 2002). TMEM67 участвует в образовании цилий, и повреждение цилий может вызвать колобому глаз, опухоли языка и медуллобластому (Yang et al., 2015b; Parisi, 2009).

TONSL задействован в онкогенезе легких и пищевода за счет стабилизации онкогенного белка MMS22L (Nguyen et al., 2012). Кроме того, было продемонстрировано взаимодействие TONSL и BRCA1, который выступает в роли супрессора опухоли при опухолях молочной железы и яичника (Hill et al., 2014).

Транслокацию TP63 описывали как явление, имеющее место в подгруппе киназа анапластической лимфомы-положительных анапластических крупноклеточных лимфом, которое ассоциируется с агрессивным течением этого заболевания (Hargood and Savage, 2015). Описывалось, что TP63 играет неоднозначную роль при раковых заболеваниях вследствие его участия в эпителиальной дифференциации, блокировке клеточного цикла и апоптозе (Lin et al., 2015). Изоформа TP63, TAp63, как описывалось, избыточно экспрессируется при злокачественных гематологических заболеваниях, тогда как о миссенс-мутациях TP63 сообщалось при плоскоклеточном раке, а о транслокациях TP63 – при лимфомах и некоторых аденокарциномах легких (Orzol et al., 2015). Аберрантный сплайсинг, приводящий к избыточной экспрессии изоформы TP63, DeltaNp63, описывался как частое явление при раковых заболеваниях человека, таких как плоскоклеточная карцинома кожи, при которой он, скорее всего, благоприятствует возникновению и прогрессированию опухоли (Missero and Antonini, 2014; Inoue and Fry, 2014).

TRIM59 стимулирует пролиферацию и миграцию клеток немелкоклеточного рака легких за счет повышения уровня белков, связанных с клеточным циклом (Zhan et al., 2015). Уровень предполагаемой убиквитинлигазы TRIM59 повышен при опухолях желудка по сравнению с неопухолевыми тканями, и уровни TRIM59 коррелируют с прогрессированием опухоли и сроком выживаемости пациента. TRIM59 взаимодействует с P53, способствуя его убиквитинированию и деградации, и за счет этого механизма TRIM59 может способствовать онкогенезу желудка (Zhou et al., 2014).

Было обнаружено, что уровень TRPC4 повышен при раке легких, раке яичника, раке головы и шеи, раке почек и немелкоклеточном раке легких (Zhang et al., 2010b; Zeng et al., 2013a; Jiang et al., 2013; Park et al., 2016).

ULBP3 экспрессируется в растворимой и связанной с мембраной изоформе во многих опухолевых клетках. Бластные клетки острого лимфобластного лейкозе у детей экспрессируют существенно более высокие уровни ULBP3 по сравнению с бластными клетками взрослых (Torelli et al., 2014). Намного более высокие уровни экспрессии гена ULBP3 были обнаружены в клеточной линии лейкоза K562 по сравнению с другими клеточными линиями лейкоза. Кроме того, он может быть обнаружен как в линиях клеток лейкоза, так и первичных злокачественных клетках лейкоза (Ma et al., 2013b). Локус ULBP3 метилирован в линиях клеток колоректального рака (Bormann et al., 2011). Повышенные уровни мРНК и уровни поверхностной экспрессии ULBP3 были обнаружены в клеточной линии SW-900 рака легких человека (Park et al., 2011). ULBP3 имеет более высокую поверхностную экспрессию в клетках лейкоза (Ogbomo et al., 2008). Уровни ULBP3 в различных линиях опухолевых клеток коррелируют с цитотоксичностью NK-клеток, тем не менее, ULBP3, по-видимому, не подходит для роли биомаркера (Wang et al., 2008; Linkov et al., 2009). ULBP3 не экспрессируется в линии клеток CNE2назофарингеальной карциномы человека (Mei et al., 2007). ULBP3 экспрессируется при раке яичника и обратно коррелирует с выживаемостью пациента (Carlsten et al., 2007; McGilvray et al., 2010). В-клетки экспрессируют ULBP3 при неходжкинской лимфоме, или он может быть обнаружен в периферической крови, костном мозге или лимфатических узлах (Catellani et al., 2007). ULBP3 экспрессируется в клетках рака молочной железы, линии клеток U251 глиобластомы, опухолях головного мозга человека и при плоскоклеточной карциноме головы и шеи (Eisele et al., 2006; Butler et al., 2009; Bryant et al., 2011; de Kruijf et al., 2012). В целях регуляции активности NK-клеток опухолевыми клетками экспрессируется растворимая и поверхностная форма ULBP3 (Mou et al., 2014). ULBP3 экспрессируется в избытке в определенных эпителиальных опухолях. Кроме того, уровень ULBP3 в сыворотке пациентов, больных раком, повышен в сравнении со здоровыми донорами (Mou et al., 2014).

Аллели VPS13B имеют мутации при мелкоклеточном раке легких (Iwakawa et al., 2015). Мутации VPS13B наблюдались при раке желудка и колоректальном раке (An et al., 2012).

Мутации сдвига рамки считывания VPS13C были обнаружены при раке желудка и колоректальном раке с микросателлитной нестабильностью (An et al., 2012).

Уровень экспрессии WDR62 был существенно повышен в тканях и клеточных линиях рака желудка и ассоциировался с низкой дифференциацией и плохим прогнозом. Более того, уровень экспрессии WDR62 был повышен в клетках с мультилекарственной устойчивостью (Zeng et al., 2013b). Избыточная экспрессия WDR62 связана с амплификацией центросом и может быть новым полезным биомаркером дифференциации и потенциальной мишенью терапии при раке яичника (Zhang et al., 2013b).

Связанный с экзосомой WDR92 ингибирует инвазию клеток рака молочной железы за счет деградации мРНК амфирегулина (Saeki et al., 2013). WDR92 усиливает апоптоз, вызванный фактором некроза опухоли альфа и циклогексимином (Ni et al., 2009).

Ген WNT5A принадлежит к семейству генов WNT, которое состоит из сходных по структуре генов, кодирующих секретлируемые сигнальные белки. Данные белки были задействованы в онкогенезе и в нескольких процессах развития, в том числе регулировании клеточной судьбы и формировании паттерна генов во время эмбриогенеза. Ген WNT5A кодирует члена семейства WNT, который является элементом как канонических, так и неканонических путей передачи сигнала WNT. Этот белок является лигандом для семипроходного трансмембранного рецептора семейства frizzled-5 и орфанного рецептора тирозинкиназы 2. Этот белок играет незаменимую роль в регулировании механизмов развития во время эмбриогенеза. Этот белок может также играть роль в онкогенезе (RefSeq, 2002). WNT5A избыточно экспрессируется в КРК и имеет уровень конкордантности 76% между первичной опухолью и местом метастазирования (Lee et al., 2014a). Уровень WNT5A повышен, и он является ведущим регулятором эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования в клетках карциномы желудка, назофарингеальной карциномы и рака поджелудочной железы человека (Kanzawa et al., 2013; Zhu et al., 2014; Bo et al., 2013).

XRN1, скорее всего, задействован в ряде регуляторных сигнальных путей мРНК в астроцитах и клетках астроцитом (Moser et al., 2007). Нокдаун XRN1 ингибировал экспрессию андрогенных рецепторов в клетках рака предстательной железы и играет важную роль в оси miR-204/XRN1 при аденокарциноме предстательной железы (Ding et al., 2015).

В ходе исследований полногеномных ассоциаций были идентифицированы полиморфизмы гена *XXYL1*. Было предложено, что эти полиморфизмы являются локусами предрасположенности к развитию немелкоклеточного рака легких (Zhang et al., 2012b).

*ZBTB20* способствует пролиферации клеток при немелкоклеточном раке легких за счет подавления *FoxO1* (Zhao et al., 2014b). Уровень экспрессии *ZBTB20* повышен при гепатоклеточной карциноме и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом (Wang et al., 2011c). Полиморфизм гена *ZBTB20* ассоциируется с раком желудка (Song et al., 2013).

Считается, что *ZFNH4* регулирует дифференциацию клеток, и его подавление связано с выживаемостью без признаков глиомы (Chudnovsky et al., 2014). Папиллярные опухоли пинеальной области головного мозга демонстрируют высокие уровни экспрессии *ZFNH4* (Fevre-Montange et al., 2006). *ZFNH4*, как было установлено, является локусом предрасположенности к базальноклеточной карциноме (Stacey et al., 2015).

*ZMYM1* является основным партнером по взаимодействию с *ZNF131*, который выполняет функции в сигнальных путях эстрогенов и пролиферации клеток рака молочной железы (Oh and Chung, 2012; Kim et al., 2016).

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

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

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение Т-клеток из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают пептиды, связанные с молекулами I класса

главного комплекса гистосовместимости (МНС), играют важную роль в этом ответе. Эти пептиды обычно состоят из 8-10 аминокислотных остатков, полученных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоле. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

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, 12, 13 или 14 аминокислот или длиннее и в случае пептидов, связанных с молекулами МНС II класса (удлиненные варианты пептидов по изобретению), они могут иметь длину в 15, 16, 17, 18, 19 или 20 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 пептидов, такими как, например, хлорид или ацетат (трифторацетат). Было замечено, что соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов в их состоянии(ях) *in vivo*, так как пептиды не являются солями *in vivo*.

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

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

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

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

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

**Таблица 4:** Частоты экспрессии F HLA-A\*02 и HLA-A\*24 и наиболее частых серологических видов HLA-DR. Частоты экспрессии выведены из частот гаплотипа Gf среди американцев, приводимых в работе Mori и соавт. (Mori et al., 1997), с использованием формулы Харди-Вейнберга  $F=1-(1-Gf)^2$ . Комбинации A\*02 или A\*24 с определенными аллелями HLA-DR вследствие неравномерного распределения связей могут быть обогащенными или менее частыми, чем ожидается от их индивидуальных частот выявления. Более подробная информация представлена в работе Chanock и соавт. (Chanock et al., 2004).

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
A*02	Европеоидная раса (Северная Америка)	49,1%
A*02	Афроамериканцы (Северная Америка)	34,1%
A*02	Монголоиды (Северная Америка)	43,2%
A*02	Латиноамериканцы (Северная Америка)	48,3%
DR1	Европеоидная раса (Северная Америка)	19,4%
DR2	Европеоидная раса (Северная Америка)	28,2%
DR3	Европеоидная раса (Северная Америка)	20,6%
DR4	Европеоидная раса (Северная Америка)	30,7%
DR5	Европеоидная раса (Северная Америка)	23,3%
DR6	Европеоидная раса (Северная Америка)	26,7%
DR7	Европеоидная раса (Северная Америка)	24,8%
DR8	Европеоидная раса (Северная Америка)	5,7%
DR9	Европеоидная раса (Северная Америка)	2,1%
DR1	Афроамериканцы (Северная Америка)	13,20%
DR2	Афроамериканцы (Северная Америка)	29,80%
DR3	Афроамериканцы (Северная Америка)	24,80%
DR4	Афроамериканцы (Северная Америка)	11,10%
DR5	Афроамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR6	Афроамериканцы (Северная Америка)	33,70%
DR7	Афроамериканцы (Северная Америка)	19,20%
DR8	Афроамериканцы (Северная Америка)	12,10%
DR9	Афроамериканцы (Северная Америка)	5,80%
DR1	Монголоиды (Северная Америка)	6,80%
DR2	Монголоиды (Северная Америка)	33,80%

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

Пептиды по изобретению, предпочтительно когда они включены в состав вакцины по изобретению согласно описанию в настоящем документе, предпочтительно связываются с A\*02, A\*24 или с аллелями II класса, как определено. Вакцина также может включать универсальные пептиды, связывающиеся с МНС II класса. Поэтому вакцина по изобретению может применяться для лечения рака у пациентов, которые являются A\*02-положительными,

причем в связи с универсальной по связыванию природе данных пептидов не нужен подбор аллотипов МНС II класса.

Если пептиды A\*02 по изобретению скомбинировать с пептидами, связывающимися с другим аллелем, например A\*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](http://www.allelefreqencies.net)).

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-кодона, 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 однострессовой ДНК такой последовательности, дуплексу такой последовательности с его комплементом (двухнителевая 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 фрагменты предлагаются в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними не-транслированными последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслированной ДНК могут присутствовать за открытой рамкой считывания, где она не интерферирует с манипуляцией или экспрессией кодирующих областей.

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

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

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

Полинуклеотиды и рекомбинантные или иммуногенные полипептиды, раскрытые в соответствии с настоящим изобретением, могут также быть в «очищенной» форме. Понятие «очищенный» не требует абсолютной чистоты; скорее оно предназначено для дачи относительного определения и может включать препараты с высокой очисткой или препараты только с частичной очисткой, в соответствии с тем, как эти термины понимаются специалистами соответствующей области. Например, отдельные клоны, выделенные из библиотеки кДНК, как обычно очищались до электрофоретической гомогенности. Очистка исходного материала или природного материала от примесей по меньшей мере на один порядок величины, предпочтительно два или три порядка, и, более предпочтительно, четыре или пять порядков величины определено рассматривается в изобретении. Более того, определено 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:  
процентная доля идентичности =  $100 [1 - (C/R)]$

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

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

(ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и

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

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

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

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

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: 388 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 388, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или – удлиненные версии упомянутых пептидов – с МНС II класса.

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

Специалист 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; Zaremba et al., 1997).

Под «вариантом» данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 388. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы МНС, такой как HLA-A\*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных

цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 388, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохранят ли такие варианты способность связываться с молекулами МНС I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

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 повсеместно встречающихся протеиногенных аминокислот) могут быть также использованы в целях замены для получения иммуногенов и иммуногенных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением.

Если были произведены замены 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 другие аминокислоты, включение которых 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 5:** Предпочтительные варианты и мотивы пептида, связывающегося с HLA-A\*02, в соответствии с SEQ ID NO: 2, 4 и 6

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

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

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

**Таблица 6:** Варианты и мотивы пептидов, связывающихся с HLA-A\*24, в соответствии с SEQ ID No: 98, 114 и 158.

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SEQ ID 158	I	Y	E	E	T	R	G	V	L	K	V	F
Вариант												I
												L
		F										
		F										I
	F											L
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SEQ ID 114	Q	Y	L	D	G	T	W	S	L			
Вариант									I			
									F			
		F										
		F							I			
	F							F				
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SEQ ID 98	V	F	P	R	L	H	N	V	L	F		
Вариант		Y								I		
		Y								L		
		Y										
										I		
									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 Таблицы 3.

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

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

Предпочтительно, чтобы Т-клетки, специфичные для пептида в соответствии с настоящим изобретением были испытаны относительно замещенных пептидов; концентрация пептида, при которой замещенные пептиды достигают половины максимального роста лизиса относительно фона, составляет не более чем около 1 мМ, предпочтительно, не более чем около 1 мкМ, более предпочтительно, не более чем около 1 нМ, 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: 388.

«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: 388, 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 (p33, в дальнейшем «Ii») HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфичным для дендритных клеток, описанных в 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, -CH<sub>2</sub>-NH, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>- и -CH<sub>2</sub>SO-. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного

синтеза непептидных связей ( $-\text{CH}_2\text{-NH}$ ) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции альдегида и аминокислоты в присутствии  $\text{NaCNBH}_3$ .

Пептиды, включающие последовательности, описанные выше, могут быть синтезированы с дополнительными химическими группами, находящимися на их аминном и/или карбоксильном концах, для увеличения стабильности, биологической доступности и/или аффинности пептидов. Например, гидрофобные группы, такие как карбобензоксильные, 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. CRC 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'-этилкарбодиимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты. Например, диэтилпирокарбонат является реагентом для модификации гистидильных остатков в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-ноненаля. Реакция остатков лизина и других  $\alpha$ -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения полиэтиленгликоля и основным сайтом модификации при гликозилировании белков. Остатки метионина в белках могут быть модифицированы, например, с помощью йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

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

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

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

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высоко щелочлабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глутамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамина (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию

кислот производное 4-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глутамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксибензотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

Очистка может быть произведена любой методикой или комбинацией таких методик как перекристаллизация, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография 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 идентификации пептидов по настоящему изобретению в банке данных по экспрессии РНК (Lonsdale, 2013) из приблизительно 3000 образцов нормальных (здоровых) тканей был проведен поиск генов с практически отсутствующей экспрессией в системах жизненно важных органов и низким уровнем экспрессии в других системах важных органов. Затем, с помощью масс-спектрометрического анализа с использованием платформы XPRESIDENT™, описанной в настоящей заявке, были идентифицированы раково-ассоциированные пептиды, образованные из белковых продуктов данных генов.

В целях выбора презентуемых в избытке пептидов был рассчитан профиль презентации, позволяющий оценить медианное значение презентации образца, а также вариации повторных измерений. В профиле сравниваются образцы опухолевой формы, представляющей интерес, с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Каждый из этих профилей может быть затем консолидирован в показатель избыточной презентации путем расчета значения  $p$  по линейной модели со смешанными эффектами (Pinheiro et al., 2015), скорректировав ее для повторных анализов на уровень ложноположительных обнаружений (Benjamini and Hochberg, 1995)(ср. Пример 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 рака (N = 377 A\*02-положительных образцов 370 доноров, N = 204 A\*24-положительных образца), 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 574 пациентов, больных раком.

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-рестриктивных 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 ткани были очищены, и HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ/МС (см. примеры). Все пептиды TUMAP, содержащиеся в настоящей заявке, были идентифицированы с помощью данного подхода на образцах первичного рака, подтверждая их презентацию на первичных опухолях: глиобластоме, раке молочной железы, колоректальном раке, почечноклеточной карциноме, хроническом лимфоцитарном лейкозе, гепатоклеточной карциноме, немелкоклеточном и мелкоклеточном раке легких, неходжкинской лимфоме, остром миелолейкозе, раке яичника, раке поджелудочной железы, раке предстательной железы, раке пищевода, в том числе раке пищеводно-желудочного перехода, раке желчного пузыря и холангиокарциноме, меланоме, раке желудка, раке яичка, раке мочевого пузыря или раке матки.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных образцах рака и нормальных тканей, были подвергнуты количественному анализу с помощью ЖХ/МС без изотопной метки, с использованием подсчета ионов. Метод основан на предположении, что площади пика пептида при анализе методом ЖХ/МС коррелируют с его содержанием в образце. Все

количественные сигналы пептида в различных экспериментах с использованием ЖХ/МС были нормализованы, исходя из основной тенденции, было вычислено их среднее значение на образец, и сведены в гистограмму в т. н. профиль презентации. В профиле презентации консолидированы различные методы анализа, такие как поиск в банке данных белков, спектральная кластеризация, деконволюция состояния заряда (разряд) и выравнивание времени удерживания и нормализация.

Кроме того, технологическая платформа XPRESIDENT® v2.1 позволяет проведение прямого абсолютного количественного определения уровня МНС-, предпочтительно HLA-рестриктированного, пептида на раковых или других инфицированных тканях. Вкратце, общее число клеток было подсчитано из общего содержания ДНК проанализированного образца ткани. Общее количество пептида TUMAP в образце ткани измеряли с помощью наноЖХ-МС/МС в виде соотношения природного пептида TUMAP и известного количества версии пептида TUMAP с изотопной меткой, так называемого внутреннего стандарта. Эффективность выделения пептида TUMAP определяли методом введения стандартной добавки комплекса пептид-МНС всех выбранных пептидов TUMAP в лизат ткани в самый ранний возможный момент процесса выделения пептида TUMAP и их обнаружением с помощью наноЖХ-МС/МС, за чем следовало завершение процедуры выделения пептида. Общее число клеток и общее количество пептида были подсчитаны по трем повторным измерениям на образец ткани. Пептид-специфическую эффективность выделения подсчитывали как средний показатель из 10 экспериментов с введением стандартных добавок с тремя повторными измерениями для каждого (см. Пример 6 и Таблицу 14).

Данный комбинированный метод анализа экспрессии РНК и данные спектрометрического анализа позволили выбрать 417 пептидов настоящего изобретения.

В настоящем изобретении предложены пептиды, полезные в лечении раковых заболеваний/опухолей, предпочтительно глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка,

рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и рака матки, которые в избытке или исключительно презентируют пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичного рака 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 или ткани, образовавшиеся в том же органе, что и опухоль, или другие нормальные клетки ткани, демонстрирующие высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. Пример 2). Более того, сами пептиды в высшей степени избыточно презентируются на опухолевой ткани – понятие «опухолевая ткань» в связи с настоящим изобретением подразумевает образец ткани пациента, страдающего раком, но не на нормальных тканях (см., например, Пример 1).

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами. Т-клетки могут уничтожать клетки, презентирующие распознанные комплексы молекулы HLA с пептидом, например, клетки глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки, презентирующие полученные пептиды.

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентируются и, поэтому, могут использоваться для получения антител и/или ТКР, такие как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. Пример 3). Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть

найденны в соответствующих литературных источниках. Таким образом, пептиды по настоящему изобретению пригодны для генерирования иммунного ответа в организме пациента для уничтожения опухолевых клеток. Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т. е. 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, способные связываться с ТКР и антителами, если они презентуются молекулой МНС. Настоящее описание также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам для экспрессии ТКР и пептидам по настоящему изобретению; и методам их применения.

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

В одном варианте осуществления согласно описанию предложен способ получения ТКР, согласно настоящему описанию, при чем 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 закоривают 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 аффинностью связывания, составляющей около 1 мкМ или ниже, около 100 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже. Неограничивающие примеры диапазонов предпочтительной аффинности связывания для ТКР по настоящему изобретению включают значения от около 1 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 формируют дисульфидную связь между последовательностью константного домена TRAC и последовательностью константного домена TRBC1 или TRBC2 ТКР.

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

ТКР по настоящему изобретению могут включать поддающуюся обнаружению метку, выбранную из группы, состоящей из радионуклида, флуорофора и биотина. ТКР по настоящему изобретению могут 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. 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 в соответствии с настоящим изобретением может быть усилена способами, хорошо известными из уровня техники.

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

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

В одном аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, нуклеиновые кислоты, кодирующие цепи ТКР-альфа и/или ТКР-бета согласно настоящему описанию, клонируют в векторы экспрессии, такие как гамма-ретровирус или - лентивирус. Рекомбинантные вирусы получают и проводят испытание их функциональности, такой как антигенная специфичность и функциональная 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<sup>+</sup> Т-клетки, полученные у здоровых доноров, в целях повторной экспрессии альфа- и/или бета-цепей опухолеспецифических ТКР.

Для увеличения уровня экспрессии нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть функционально связаны с сильными промоторами, такими как длинные терминальные повторы ретровируса (LTR), цитомегаловируса (CMV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) U3, фосфоглицерат-киназой (PGK),  $\beta$ -актином, убиквитином и комбинированным промотором вируса обезьян 40 (SV40)/CD43, фактором элонгации (EF)-1a и промотором вируса некроза селезёнки (SFFV). В предпочтительном варианте осуществления промотор является гетерологичным по отношению к экспрессируемой нуклеиновой кислоте. В дополнение к сильным промоторам экспрессионные кассеты ТКР согласно настоящему описанию могут содержать дополнительные элементы, которые могут усиливать экспрессию трансгена, включая центральный полипуриновый тракт (сРРТ), который способствует ядерной транслокации лентивирусных конструкций (Follenzi et al., 2000), и пост-транскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (wPRE), который повышает уровень экспрессии трансгена за счет увеличения стабильности РНК (Zufferey et al., 1999).

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

Для достижение 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). (Schmitt et al. 2009).

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

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

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными эквивалентами (С-концевой «муринизированный» домен ); получение второй межцепочечной дисульфидной связи в С-концевом домене за счет введения

второго остатка цистеина в обе цепи: ТКР-альфа и ТКР-бета введенного ТКР (модификация цистеином); обмен взаимодействующими остатками в С-концевом домене ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей («выступ-во-впадину»); и слияние переменных доменов цепей ТКР-альфа и ТКР-бета непосредственно в CD3 $\zeta$  (слияние CD3 $\zeta$ ). (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 рамках лечения. Предпочтительно, если фармацевтическая композиция является стерильной и произведена в соответствии с правилами GMP (надлежащей производственной практики).

Фармацевтические композиции включают пептиды как в свободной форме, так и в форме фармацевтически приемлемой соли (см. также выше). Используемое в контексте данного изобретения понятие «фармацевтически приемлемая соль» относится к производным раскрытых пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислых или основных солей вещества. Например, кислые соли получают из свободного основания (как правило, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу –NH<sub>2</sub>) 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 особенно предпочтительном варианте осуществления фармацевтические композиции включают пептиды в виде солей уксусной кислоты (ацетаты), трифторацетатов или соляной кислоты (хлориды).

Предпочтительно, если лекарственное средство 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 388, 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, присоединенные встречающимися в природе пептидными связями, могут кодироваться полинуклеотидом. В другом аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид в соответствии с изобретением.

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

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

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

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящем хозяине для получения полипептида, включающего пептид или вариант по изобретению. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант по изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению. Такие методики включают те, что раскрыты, например, в патентах США №№ 4 440 859, 4 530 901, 4 582 800, 4 677 063, 4 678 751, 4 704 362, 4 710 463, 4 757 006, 4 766 075 и 4 810 648.

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

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

последовательности ДНК с любыми необходимыми элементами контроля, которая кодирует выбранный признак в трансформированной клетке, такой как устойчивость к антибиотикам.

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

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

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

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, цитоплазмическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, с-тус или MAT. Данные слитые белки позволяют проводить выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

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

В другом предпочтительном варианте осуществления кодируются два или более пептида или варианта пептидов по изобретению и, таким образом, они экспрессируются последовательно (как в случае структуры типа «бусины на нити»). В этих целях пептиды или варианты пептидов могут быть соединены или слиты воедино с помощью фрагментов линкерных аминокислот, таких как, например, LLLLLL, или же могут быть соединены без какого(их)-либо дополнительного(ых) пептида(ов) между ними. Эти структуры могут быть также использованы в противораковой терапии и, возможно, индуцировать иммунные ответы с участием как молекул 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 дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как линии фибробластных клеток и клеток толстой кишки таких видов как мышь, крыса, обезьяна или человек. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и

УРН501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Калифорния 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (СНО), имеющиеся в наличии в АТСС как ССL61, эмбриональные клетки швейцарской мыши линии НИН/3Т3, имеющиеся в наличии в АТСС как СRЛ 1658, клетки COS-1 из почек обезьяны, имеющиеся в наличии в АТСС как СRЛ 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 Stratagene Cloning Systems или Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Мэриленд 20877, США. Электропорация также подходит для трансформации и/или трансфекции клеток и хорошо известна из уровня техники для трансформации дрожжевых клеток, бактериальных клеток, клеток насекомых и клеток позвоночных.

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

Следует понимать, что некоторые клетки-хозяева по изобретению подходят для получения пептидов по изобретению, например, бактериальные, дрожжевые клетки и клетки насекомых.

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

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, в частности, дендритной клеткой или антигенпрезентирующей клеткой. АПК, нагруженные рекомбинантным слитым белком, содержащим простатическую кислую фосфатазу (PAP), были одобрены Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) 29 апреля 2010 г. для применения при лечении метастатического HRPC (гормон-рефрактерного рака предстательной железы), протекающего бессимптомно или с минимально выраженными симптомами (сипулейцел-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. Вводиться могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 мкг до 500 мкг пептида или ДНК, в зависимости от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данном диапазоне успешно использовалась в предыдущих клинических исследованиях (Walter et al., 2012).

Полинуклеотид, применяемый в активной вакцинации, может быть по существу чистым или содержаться в подходящем векторе или системе доставки. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинацией. Методы конструирования и введения такой

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

Лекарственное средство 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 лекарственном средстве по настоящему изобретению. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, СуаА, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии «вода в масле» и «масло в воде», ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторную систему RepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстране микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонина, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъюванты, такие как Detox компании Ribicel, 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-), 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 иммуноадьюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адьювантов 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 адьювантов, таких как квасцы или неполный адьювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адьювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адьювантами 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 В1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адьювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двуцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом

фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

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

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

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

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

адъювантами являются монтанид IMS 1312, монтанид ISA 206, монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и моноклональные антитела к CD40 или их комбинации.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутривенное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и – необязательно – другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены вместе с иммуностимулирующими агентами, такими как цитокины. Обширный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, может быть взят, например, из работы 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 EP2112253.

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 опухлеассоциированных 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 переменный участок тяжелой цепи антитела и переменный участок легкой цепи антитела, связывающие белки, включающие по меньшей мере один мотив анкиринового повтора и однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы, аптамеры, (растворимые) ТКР и (модифицированные) клетки, такие как аллогенные или аутологичные Т-клетки. Чтобы оценить, является ли молекула каркасом, связывающимся с мишенью, может быть проведен анализ связывания.

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

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

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

Для получения дальнейшей информации о полипептидных каркасах см., например, раздел уровня техники патентной заявки WO 2014/071978A1 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 388, в соответствии с представленным изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

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

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

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

Соответствующие способы получения таких антител и одноцепочечных главных комплексов гистосовместимости I класса, в равной степени как и другие инструменты для получения данных антител, раскрыты в патентных заявках WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 и в опубликованных работах (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; 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 388 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 388, 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 388 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 388, 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: 388.

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 к экспрессии или экспрессировать нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности в лечении раковых заболеваний, например, глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка (РЖ), рака яичка (ТР), рака мочевого пузыря (РМП), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или рака матки (РЭМ).

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 388 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 лекарственного средства или в изготовлении лекарственного средства. Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с настоящим изобретением, где лекарственное средство проявляет противораковую активность.

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

способу применения в соответствии с изобретением, где лекарственное средство проявляет противораковую активность.

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками солидных или гематологических опухолей, например, глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или рака матки. 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 «полноразмерным» молекулам иммуноглобулина в понятие «антитела» включены также фрагменты (например, участки CDR, фрагменты F<sub>v</sub>, 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза,

гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или рака матки, доставляют токсин к клетке рака, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептидного маркера рака) в соответствии с изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или рака матки 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: 388, 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 упомянутых выше видов рака, использованным для получения антитела в соответствии с изобретением.

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 иммуноксина). 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 клиническими методами анализа.

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

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены при использовании гибридного метода. В рамках гибридного метода мышь или другое подходящее животное-хозяин обычно иммунизируется иммунизирующим веществом, чтобы инициировать лимфоциты, которые вырабатывают или способны вырабатывать антитела, которые будут

специфически связываться с иммунизирующим веществом. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

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

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

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

опытного специалиста данной области и могут включать сайт-специфический мутагенез нуклеиновой кислоты, кодирующей фрагмент антитела.

Антитела по изобретению могут далее включать гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител - это химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab' или другие антиген-связывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающая способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированном CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по сути все 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 № 4 816 567), 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, внутривентриально, подкожно, внутримышечно) или другими способами, такими как вливание, которое гарантирует доставку к кровотоку эффективным образом. Антитела также могут вводиться интратуморальными или перитуморальными способами, чтобы

вызвать местные, а также и системные терапевтические эффекты. Предпочтительными являются местное или внутривенное введение.

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых лекарственных средств. 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или рака матки, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту в 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 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), доменами, рекрутирующими эффекторные клетки, такими как анти-CD3 домен, и т. д. Более того, он может быть экспрессирован на Т-клетках, используемых для адоптивного переноса. Дополнительную информацию можно найти в патентных заявках WO 2004/033685A1 и WO 2004/074322A1. Комбинация растворимых ТКР описывается в патентной заявке WO 2012/056407A1. Другие способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586A1.

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

Антитела или ТКР могут также применяться для диагностики *in vivo*. Как правило, антитело помечают радионуклеотидом (таким как  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  или  $^{35}\text{S}$ ), 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  $1 \times 10^{-6}$  мМ.

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 предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 388 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 костимуляторной активностью, такие как антитела к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система часто требует добавления соответствующих растворимых факторов, к примеру, цитокинов, таких как интерлейкин-12.

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

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая aberrантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO 388.

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

Клетками-мишенями *in vivo* для CD8-положительных Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением могут быть клетки опухоли (которые иногда экспрессируют молекулы МНС II

класса) и/или стромальные клетки, окружающие опухоль (опухолевые клетки) (которые иногда также экспрессируют молекулы МНС II класса; (Dengjel et al., 2006)).

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

Под понятием «абберрантно 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 5 или 10 раз выше уровня, представленного в нормальной ткани.

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

Протоколы для этого так называемого адоптивного переноса Т-клеток хорошо известны из уровня техники. С обзорами можно ознакомиться в работах Gattioni и соавт. и Morgan и соавт. (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 лекарственного средства или в изготовлении лекарственного средства. 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 (vii) 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 адьюванты (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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря или рака матки, лекарственное средство по изобретению предпочтительно применяется для лечения глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или рака матки.

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 определено 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 опухолиассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались в опухолевой ткани пациентов с глиобластомой, раком молочной железы, колоректальным раком, почечноклеточной карциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, гепатоклеточной карциномой, немелкоклеточным и мелкоклеточным раком легких, неходжкинской лимфомой, острым миелолейкозом, раком яичника, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, раком пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, раком желчного пузыря и холангиокарциномой, меланомой, раком желудка, раком яичка, раком мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномой головы и шеи (ПлККГШ) или раком матки 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 опухолиассоциированных пептидов, собранных из нескольких раковых тканей, хранилище может содержать маркерные пептиды, связанные с HLA-A\*02 и HLA-A\*24. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов

положительного контроля, полученных «не из собственного» антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из «собственных» антигенов. И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

Пептиды TUMAP для хранилища были идентифицированы с помощью интегрированного подхода функциональной геномики, комбинирующего анализ экспрессии генов, масс-спектрометрию и Т-клеточную иммунологию (XPresident®). Этот подход гарантирует, что только те пептиды TUMAP, которые действительно присутствуют в большом проценте опухолей, но не экспрессируются или экспрессируются лишь минимально на нормальной ткани, были выбраны для последующего анализа. В целях первоначального отбора пептидов образцы глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) и рака матки 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 по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома.
3. Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, презентруемые в избытке или селективно презентруемые на опухолевой ткани, предпочтительно кодируемые селективно экспрессированными или экспрессированными в избытке генами, выявленными на этапе 2, считали подходящими TUMAP-кандидатами для мультипептидной вакцины.
4. Было произведено изучение литературы для выявления дополнительных свидетельств, подтверждающих релевантность идентифицированных в качестве TUMAP пептидов.

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

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

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<sup>+</sup> Т-клеток здоровых доноров клетками, презентующими искусственный антиген, нагруженными комплексами пептид-МНС и антителами к CD28.

Этот способ является предпочтительным для редких видов рака и пациентов с редким профилем экспрессии. В отличие от мультипептидных коктейлей с постоянным составом, уже разработанных на данное время, «хранилище» позволяет достигнуть существенно более высокого соответствия фактической экспрессии антигенов в опухоли 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 абберрантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью. Предпочтительно, если последовательности лигандов МНС идентифицируются с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов. Предпочтительно, если опухолевый образец и нормальная ткань получены от одного и того же пациента.

Помимо этого, или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием модели хранилища (банка данных) пептиды TUMAP могут быть идентифицированы у пациента *de novo* и затем быть включены в вакцину. В качестве одного примера: пептиды-кандидаты TUMAP могут быть идентифицированы у пациента с помощью (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или абберрантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера: могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для

опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную, не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белок участков (повторное секвенирование экзона). В этих целях экзонную ДНК из человеческих образцов фиксируют с помощью поставляемых изготовителем наборов для обогащения целевыми фрагментами, за чем следует секвенирование, например, с помощью системы HiSeq2000 (Illumina). В дополнение к этому опухолевую мРНК секвенируют для прямого количественного определения генной экспрессии и подтверждения того, что мутировавшие гены экспрессированы в опухолях пациентов. Считывание полученных в результате миллионов последовательностей осуществляется алгоритмами программного обеспечения. Получаемый список содержит мутации и экспрессию генов. Опухолеспецифические соматические мутации определяют сравнением с вариантами зародышевой линии из МПК и устанавливают приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища, и пептиды-кандидаты TUMAP, обладающие подходящей иммуногенностью, выбирают для включения в вакцину.

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью: (а) идентификации опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), 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 внутрикожной инъекции.

Кроме того, пептиды по настоящему изобретению пригодны не только для лечения рака, но и также в качестве диагностических средств. Так как пептиды были получены из образцов глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, мелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи

(ПлККГШ) или рака матки, 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака яичка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или рака матки. 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, адоптивным переносом лимфоцитов. В условиях,

когда проводится генная терапия, в целях оценки побочных эффектов могут быть проанализированы ответы лимфоцитов на пептиды. Мониторинг реакций лимфоцитов может также быть ценным инструментом для обследований в рамках последующего наблюдения после трансплантации, к примеру, для выявления реакций «хозяин против трансплантата» и «трансплантат против хозяина».

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.

## **ФИГУРЫ**

На Фигуре 1A представлена избыточная презентация различных пептидов в нормальных тканях (белые столбцы) и различных видах рака (черные столбцы). Фигура 1A) символ гена: IGFBPL1, пептид: LLPLLPLSPSLG (SEQ ID NO: 33) - ткани слева направо: 1 клеточная линия (1 поджелудочная железа), 1 нормальная ткань (1 щитовидная железа), 22 раковые ткани (5 раков головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак толстой кишки, 1 рак пищевода, 1 рак желчного пузыря, 1 рак печени, 10 раков легких, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак желудка); Фигура 1B) символ гена: HIVER1, пептид: NYIPVKNGKQF (SEQ ID NO: 103) - ткани слева направо: 11 раковых тканей (1 рак головного мозга, 1 рак печени, 8 раков легких, 1 рак предстательной железы); Фигура 1C) символ гена: GET4, пептид: EYLDRIGQLFF (SEQ ID NO: 131) - ткани слева направо: 2 нормальные ткани (1 почка, 1 легкое), 41 раковая ткань (2 рака головного мозга, 1 рак почек, 3 рака печени, 29 раков легких, 2 рака предстательной железы, 4 рака желудка); Фигура 1D) символ гена: N4BP2, пептид: FYINGQYQF (SEQ ID NO: 176) - ткани слева направо: 1 клеточная линия (1 предстательная железа), 3 нормальные ткани (1 почка, 1 гипофиз, 1 кожа), 67 раковых тканей (4 рака головного мозга, 2 рака печени, 42 рака легких, 12 раков предстательной железы, 7 раков желудка); На Фигурах 1E) – Z) представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях по сравнению с нормальными тканями. В анализ были включены данные более 440 образцов нормальных тканей и 526 образцов тканей, пораженных раком. Показаны только образцы, где была обнаружена презентация пептида. Фигура 1E) символ гена: AKR1C1, AKR1C3, пептид: HLYNNEEQV (SEQ ID NO: 16) - ткани слева направо: 1 клеточная линия (поджелудочная железа), 15 раковых тканей (1 рак желчного протока, 1 рак пищевода, 6 раков печени, 5 раков

легких, 2 раков мочевого пузыря); Фигура 1F) символ гена: RPS26P39, RPS26P11, RPS26, RPS26P28, RPS26P20, RPS26P15, RPS26P50, RPS26P2, RPS26P25, RPS26P58, пептид: YVLPKLYVKL (SEQ ID NO: 35) - ткани слева направо: 1 нормальная ткань (1 образец лейкоцитов), 8 раковых тканей (1 рак головы и шеи, 3 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак желчного пузыря, 1 рак толстой кишки, 1 рак лимфатического узла); Фигура 1G) символ гена: CLDN4, CLDN3, CLDN14, CLDN6, CLDN9, пептид: SLLALPQDLQA (SEQ ID NO: 40) - ткани слева направо: 21 раковая ткань (1 рак желчного протока, 1 рак молочной железы, 3 рака толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 6 раков легких, 2 рака яичника, 1 рак предстательной железы, 3 рака мочевого пузыря, 3 рака матки); Фигура 1H) символ гена: KLHDC7B, пептид: VLSPFILTL (SEQ ID NO: 42) - ткани слева направо: 18 раковых тканей (1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак молочной железы, 1 рак почки, 6 раков легких, 3 рака лимфатических узлов, 2 рака яичника, 2 рака мочевого пузыря, 1 рак матки); Фигура 1I) символ гена: ATR, пептид: SLLSHVIVA (SEQ ID NO: 53) - ткани слева направо: 3 клеточные линии (1 линия клеток крови, 2 поджелудочные железы), 21 раковая ткань (1 рак головы и шеи, 1 рак желчного протока, 2 лейкоцитарных лейкоза, 1 молочной железы, 2 рака пищевода, 1 рак желчного пузыря, 1 рак почки, 1 рак печени, 2 рака легких, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак яичника, 3 рака кожи, 1 рак мочевого пузыря); Фигура 1J) символ гена: PGAP1, пептид: FITDFYTTV (SEQ ID NO: 66) - ткани слева направо: 1 линия клеток (1 кожа), 1 нормальная ткань (1 толстая кишка), 13 раковых тканей (1 рак головы и шеи, 6 раков головного мозга, 1 рак толстой кишки, 1 рак печени, 2 рака кожи, 2 рака мочевого пузыря); Фигура 1K) символ гена: ZNF679, SAPCD2, пептид: RLLPKVQEV (SEQ ID NO: 325) - ткани слева направо: 4 клеточные линии (2 линии клеток крови, 1 почка, 1 толстая кишка), 22 раковые ткани (1 рак миелоидных клеток, 1 рак молочной железы, 1 рак пищевода, 4 рака толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 10 раков легких, 2 рака яичника, 1 рак желудка, 1 рак мочевого пузыря); Фигура 1L) символ гена: ZDHHC24, пептид: VLGPGPPPL (SEQ ID NO: 339) - ткани слева направо: 2 клеточные линии (1 почка, 1 поджелудочная железа), 19 раковых тканей (4 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак костного мозга, 2 рака головного мозга, 1 рак печени, 2 рака легких, 6 раков лимфатических узлов, 1 рак кожи, 1 рак матки); Фигура 1M) символ гена: ORC1, пептид: VYVQILQKL (SEQ ID NO: 111) - ткани слева направо: 1 нормальная ткань (1 печень), 32 раковые ткани (2 рака печени, 24 рака легких, 6 раков желудка); Фигура 1N) символ гена: RIF1, пептид: IYSFHTLSF (SEQ ID NO: 113) - ткани слева направо: 28 раковых тканей (1 рак предстательной железы, 1 рак головного мозга, 25 раков легких, 2 рака желудка); Фигура 1O) символ гена: ANKRD5, пептид: RYLNKSFVL (SEQ ID

NO: 115) - ткани слева направо: 1 нормальная ткань (1 желудок), 25 раковых тканей (1 рак головного мозга, 2 рака печени, 17 раков легких, 2 рака предстательной железы, 3 рака желудка); Фигура 1P) символ гена: IGFLR1, пептид: RYGLPAAWSTF (SEQ ID NO: 121) - ткани слева направо: 20 раковых тканей (2 рака печени, 17 раков легких, 1 рак желудка); Фигура 1Q) символ гена: CCR8, пептид: VYALKVRTI (SEQ ID NO: 145) - ткани слева направо: 25 раковых тканей (25 раков легких); Фигура 1R) символ гена: CLEC5A, пептид: SYGTVSQIF (SEQ ID NO: 148) - ткани слева направо: 5 нормальных тканей (1 печень, 3 легких, 1 гипофиз), 100 раковых тканей (10 раков головного мозга, 4 рака печени, 74 рака легких, 1 рак предстательной железы, 11 раков желудка); Фигура 1S) символ гена: FOXJ1, пептид: IYKWITDNF (SEQ ID NO: 155) - ткани слева направо: 4 нормальные ткани (4 почки), 53 раковых тканей (10 раков головного мозга, 1 рак печени, 26 раков легких, 1 рак предстательной железы, 15 раков желудка); Фигура 1T) символ гена: IFNG, пептид: KYTSYILAF (SEQ ID NO: 162) - ткани слева направо: 3 клеточные линии (3 предстательные железы), 4 нормальные ткани (1 печень, 1 легкое, 1 поджелудочная железа, 1 желудок), 95 раковых тканей (1 рак почки, 5 раков печени, 71 рак легких, 2 рака предстательной железы, 16 раков желудка); Фигура 1U) символ гена: KLHL11, пептид: EYFTPLLSGQF (SEQ ID NO: 165) - ткани слева направо: 10 раковых тканей (10 раков легких); Фигура 1V) символ гена: TMEM189, пептид: LYSPVPFTL (SEQ ID NO: 175) - ткани слева направо: 42 раковые ткани (4 рака головного мозга, 1 рак печени, 30 раков легких, 7 раков желудка); Фигура 1W) символ гена: BUB1, пептид: EYNSDLHQFF (SEQ ID NO: 345) - ткани слева направо: 13 раковых тканей (3 рака головного мозга, 10 раков легких); Фигура 1X) символ гена: CASC5, пептид: IYVIPQPHF (SEQ ID NO: 346) - ткани слева направо: 21 раковая ткань (3 рака головного мозга, 1 рак почки, 1 рак печени, 14 раков легких, 2 рака желудка); Фигура 1Y) символ гена: KIF18A, пептид: VYNEQIRDLL (SEQ ID NO: 354) - ткани слева направо: 13 раковых тканей (1 рак головного мозга, 11 раков легких, 1 рак желудка); и Фигура 1Z) символ гена: PSMA8, PSMA7, пептид: VFSPDGHLF (SEQ ID NO: 360) - ткани слева направо: 33 раковые ткани (4 рака печени, 27 раков легких, 1 рак предстательной железы, 1 рак желудка).

На Фигурах 2 представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы при различных видах рака в ряду нормальных тканей (белые столбцы) и различных образцах рака (черные столбцы). Фигура 2A) символ гена: MXRA5 - ткани слева направо: 61 образец нормальных тканей (6 артерий, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2

легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 1 поджелудочная железа, 1 гипофиз, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 5 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 матка) и 70 образцов раковой ткани (10 раков молочной железы, 11 раков легких, 12 раков яичника, 11 раков пищевода, 26 раков поджелудочной железы); Фигура 2B) символ гена: KIF26B - ткани слева направо: 61 образец нормальных тканей (6 артерий, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 1 поджелудочная железа, 1 гипофиз, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 5 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 матка) и 58 образцов раковой ткани (10 раков молочной железы, 11 раков легких, 11 раков пищевода, 26 раков поджелудочной железы); Фигура 2C) символ гена: IL411 - ткани слева направо: 61 образец нормальных тканей (6 артерий, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 1 поджелудочная железа, 1 гипофиз, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 5 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 матка) и 34 образца раковой ткани (11 раков легких, 12 раков яичника, 11 раков пищевода); Фигура 2D) символ гена: TP63 - ткани слева направо: 61 образец нормальных тканей (6 артерий, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 1 поджелудочная железа, 1 гипофиз, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 5 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 матка) и 11 образцов рака пищевода.

На Фигуре 3 показаны типичные данные по иммуногенности: результаты проточного цитометрического анализа после пептид-специфического окрашивания мультимеров.

На Фигуре 4 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8<sup>+</sup> Т-клеток здорового HLA-A\*02<sup>+</sup> донора. CD8<sup>+</sup> Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A\*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SeqID No 2 (А, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 9 (В, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 331 (С, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров А\*02/ SEQ ID NO: 2 (А), А\*02/ SEQ ID NO: 9 (В) или А\*02/ SEQ ID NO: 331 (С). Правые секции (А, В и С) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и А\*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> лимфоцитов.

На Фигуре 5 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8<sup>+</sup> Т-клеток здорового HLA-A\*24<sup>+</sup> донора. CD8<sup>+</sup> Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A\*24 в комплексе с пептидом с последовательностью SeqID No 99 (А, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 119 (В, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 142 (С, левая панель) и пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 174 (D, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров А\*24/ SEQ ID NO: 99 (А), А\*24/ SEQ ID NO: 119 (В), А\*24/ SEQ ID NO: 142 (С) или А\*24/ SEQ ID NO: 174 (D). Правые секции (А, В, С и D) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и А\*24. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> лимфоцитов.

#### ПРИМЕРЫ

#### ПРИМЕР 1:

#### Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентируемых на поверхности клетки

##### Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены после получения информированного согласия всех пациентов в письменной форме перед проведением хирургической операции или аутопсии. Сразу же после удаления ткани были подвергнуты шоковой заморозке и хранились до выделения TUMAP-пептидов при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже.

Пептиды выбирали, если два условия соответствовали действительности: (1) лежащий(ие) в его основе транскрипт(ы) и/или экзон(ы) экспрессируются на очень низких уровнях, т. е. требовалось, чтобы медианное число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион ридов (RPKM), составляло менее двух, и чтобы 75% квартиль составлял менее 5 для следующих органов: головной мозг, кровеносный сосуд, сердце, печень, легкие, кровь. Кроме того, требовалось, чтобы медианный показатель RPKM составлял менее 10 для следующих органов: мочевого пузыря, слюнная железа, желудок, надпочечная железа, толстая кишка, тонкая кишка, селезенка, костный мозг, поджелудочная железа, мышца, жировая ткань, кожа, пищевод, почка, щитовидная железа, гипофиз, нерв. (2) пептид был опухолеассоциированным, т. е. он встречается специфически или на опухолях или экспрессируется в избытке по сравнению с фоновым уровнем нормальных тканей (ср. Пример 1).

Количество выбранных образцов для пептидов TUMAP, рестриктированных по HLA-A\*02: для рака поджелудочной железы N=16, для рака почки N= 20, для колоректального рака N=28, для рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода N= 15, для опухолей предстательной железы N=35, для гепатоклеточной карциномы N=16, для немелкоклеточного рака легких N=88, для рака желудка N=29, для рака молочной железы N=9, для меланомы N=3, для рака яичника N=20, для хронического лимфоцитарного лейкоза N=13 (12 доноров), для рака мочевого пузыря N=5, для рака яичка N=1, немелкоклеточного рака легких N=18 (13 доноров), для рака желчного пузыря и холангиокарциномы N=3, для острого миелолейкоза N=5 (4 донора), для глиобластомы N=40 и для рака матки N=5.

Количество выбранных образцов для пептидов TUMAP, рестриктированных по HLA-A\*24: для рака желудка N=44, для опухолей предстательной железы N=37, для немелкоклеточного рака легких N=88, для гепатоклеточной карциномы N=15, для рака почки N=2, для колоректального рака N=1 и для глиобластомы N=17.

#### 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 опубликованным протоколом (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) с незначительными изменениями при использовании HLA-A\*02-специфического антитела BB7.2 или HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, HLA II класса-специфического антитела L243, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

#### Масс-спектрометрический анализ

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

природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

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 вариабельности внутри технических и биологических повторных измерений. Таким образом, каждый идентифицированный пептид может быть ассоциирован с количественными данными, позволяющими провести относительную количественную оценку образцов и тканей. Кроме того, все количественные данные, полученные для пептидов-кандидатов, были проконтролированы вручную в целях обеспечения взаимосогласованности данных и для проверки точности автоматического метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариабельность репликатов. В профиле сравниваются образцы различных раковых тканей с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на Фигуре 1.

В Таблицах 8 (А и Б) и 9 (А и Б) показана презентация выбранных пептидов при различных раковых заболеваниях, и, таким образом, особая значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных видов рака (например, пептид с последовательностью с SEQ ID No. 1 – для рака мочевого пузыря, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного рака легких и рака поджелудочной железы, пептид с последовательностью с SEQ ID No. 2 – для рака почки, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, глиобластомы, ... и т. д.).

**Таблица 8А:** Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA-A\*02, настоящего изобретения по видам заболеваний. ГБ = глиобластома, РМЖ= рак молочной железы, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечноклеточная карцинома, ХЛЛ = хронический лимфоцитарный лейкоз, ГКК = гепатоклеточная карцинома, НМРЛ= немелкоклеточный рак легких, МРЛ = мелкоклеточный рак легких, НХЛ = неходжкинская лимфома (8 образцов), ОМЛ = острый миелоидный лейкоз, РЯ = рак яичника, РПЖ = рак поджелудочной железы, клРПЖ = клеточные линии рака поджелудочной железы, РПрЖ= рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, РП = рак пищевода, в том числе рак пищевода-желудочного перехода, РЖП\_ХК = аденокарцинома желчного пузыря и холангиокарцинома, МЕЛ = меланома, РЖ = рак желудка, ТР = рак яичка, РМП = рак мочевого пузыря, РЭМ = рак матки.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
1	HLYNNEEQV	РМП, РП, ГКК, НМРЛ, клРПЖ
2	ALYGKLLKL	ПКК, РП, ГБ, РМЖ, ХЛЛ, РМП, ГКК, МРЛ, НМРЛ, КРК, РЯ, РЖ, НХЛ
4	ELAEIVFKV	КРК, ХЛЛ, НМРЛ, ГБ
5	SLFGQEVYC	ГКК, ГБ, КРК
6	FLDPAQRDL	РМП, НМРЛ, ГБ, ОМЛ, клРПЖ
7	AAAAKVPEV	НМРЛ, ГБ, КРК
8	KLGPFLNA	РЖ, ГБ, клРПЖ, НМРЛ
9	FLGDYVENL	ХЛЛ, КРК, РМП
10	KTLDVFNIL	ХЛЛ, РЖ, РЖП_ХК, РП
11	GVLKVLENV	ГКК, НМРЛ, РЖ, РЯ, РП
12	GLIYEETRGV	РЖ, РП, НМРЛ, НХЛ
13	VLRDNIQGI	НМРЛ, РЖП_ХК, РЯ, РЖ, РМЖ, РП, КРК, ГБ, РЭМ, ХЛЛ, ПКК, РМП, ГКК, МЕЛ, МРЛ, НХЛ
15	ALGDYVHAC	ГКК, РЖ
16	PLWGKVFYL	РЖП_ХК, НМРЛ, ГБ, клРПЖ, КРК
17	ILHENHIFL	ПКК, НМРЛ
19	TLLPTVLT	ПКК, РМП, МРЛ
20	ALDGHLYAI	ПКК, РМП, РЖ
21	SLYHRVLLY	ПКК, РП, НМРЛ
22	MLSDLTLQL	КРК, РПрЖ, ПКК, НМРЛ, РМЖ, РЖ, МРЛ, РПЖ, РП
23	AQTVVVIKA	РЖ
24	FLWNGEDSAL	РПЖ, КРК
25	IQADDFRTL	РЖ
26	KVDGVVIQL	РП, РЖ
27	KVFGDLQV	РП, РЖ
29	TLCNKTFTA	РПрЖ, ГБ
30	TVIDECTRI	РЖ

31	ALSDETKNNWE V	ОМЛ, ХЛЛ
32	ILADEAFFSV	ХЛЛ, РПЖ, ГБ, РМП, РПрЖ, КРК, МРЛ, ГКК, ПКК, РЯ, НМРЛ, МЕЛ, РП, клРПЖ, РЖ, РМЖ, НХЛ
34	LLPKKTESHHK T	КРК, ГКК, НМРЛ, ГБ
35	YVLPKLYVKL	ХЛЛ, КРК, НМРЛ, РЖП_ХК, РМП, РП
36	KLYGIEIEV	НМРЛ, ГБ, ПКК
37	ALINDILGELVK L	клРПЖ, КРК, ПКК, ГКК
38	KMQEDLVTL	НМРЛ, ПКК, РЯ, РЖ, РЖП_ХК, РП, клРПЖ, ГБ, РМЖ, РПрЖ, РПЖ, РЭМ, ГКК, КРК, МРЛ, НХЛ
39	ALMAVVSGL	РП, РЖП_ХК, ХЛЛ, РМЖ, ГКК, РМП, НМРЛ, РЯ, РЖ, МЕЛ
40	SLLALPQDLQA	РПрЖ, НМРЛ, КРК, РМП, РЯ
41	FVLPLVVTL	РЯ, РП, ХЛЛ, РПрЖ, МРЛ, НМРЛ, НХЛ
42	VLSPFILTL	НМРЛ, ПКК, РМЖ, РМП, РЯ, НХЛ
43	LLWAGPVTA	ХЛЛ, ГКК, КРК, НМРЛ, ПКК, РМП, НХЛ, ТР
44	GLLWQIKV	КРК, НМРЛ, РЖ
45	VLGPTPELV	КРК, МРЛ, РЖ, клРПЖ, РПЖ
46	SLAKHGIVAL	РПЖ, НМРЛ, КРК, ПКК, РЯ, клРПЖ, РПрЖ, НХЛ
47	GLYQAQVNL	НМРЛ, МРЛ
48	TLDHKPVTV	РЯ, РПрЖ, НМРЛ
49	LLDESKLTL	РМП, РЯ, РПрЖ, НМРЛ, ПКК
50	EYALLYHTL	КРК, РЖ
51	LLLDGDFTL	МРЛ, ГКК
52	ELLSSIFFL	РМП, НМРЛ, КРК, ПКК
53	SLLSHVIVA	клРПЖ, ПКК, РЖП_ХК, РМП, НМРЛ
54	FINPKGWNLL	РМП, НМРЛ, клРПЖ
55	IASAIVNEL	РМЖ, РЖ
56	KILDLTRVL	КРК, НМРЛ
57	VLISSVRL	клРПЖ, ПКК, ХЛЛ, НХЛ
58	ALDDSLTSL	клРПЖ, РПЖ, ГБ
59	ALTKILAEI	РМП, НМРЛ
60	FLIDTSASM	РМП, МРЛ, ПКК
61	HLPDFVKQL	РМЖ, ХЛЛ, РЖП_ХК
62	SLFNQEVQI	ХЛЛ, НХЛ
63	TLSSERDFAL	НМРЛ, РЖ
66	FITDFYTTV	ГБ
67	GVIETVTSL	НМРЛ, РЖ, КРК
68	ALYGFFFKI	РМП
69	GIYDGILHSI	РЭМ, ГБ
70	GLFSQHFNL	ГКК, НМРЛ
71	GLITVDIAL	МРЛ, РПрЖ
72	GMIGFQVLL	РМП, РЯ, ХЛЛ, ГБ, РЖП_ХК
74	ILDETLNV	РМП, МРЛ, НХЛ

76	ILLDESNFNHFL	НМРЛ
77	IVLSTIASV	клРПЖ, КРК, РПрЖ
81	VLFLGKLLV	КРК, РМП
82	VLLRVLIL	НМРЛ, ТР
83	ELLEYPQL	РПЖ, РЖП_ХК
84	FLEEEITRV	КРК, РЖ
85	STLDGSLHAV	РП, РПрЖ, РЖ
87	YLTEVFLHVV	ХЛЛ, НХЛ
89	YLVAHNLLL	ПКК
90	GAVAEVLSSI	ГБ
92	LLRGPPVARA	клРПЖ, РПЖ, ПКК, РМП, РП
93	SLLTQPIFL	ПКК, ГКК
321	SLWFKPEEL	РЖ, РМЖ, ХЛЛ, РПЖ, ГБ, РМП, РПрЖ, КРК, МРЛ, ГКК, МЕЛ, РЯ, НМРЛ, РЖП_ХК, РП, клРПЖ, НХЛ
322	ALVSGGVAQA	РЖП_ХК, РП, РМЖ, ХЛЛ, РМП, ГКК, РПЖ, МРЛ, НМРЛ, КРК, РЯ, НХЛ
323	ILSVVNSQL	КРК, РЖ, РМЖ, РЯ, ХЛЛ, НМРЛ, НХЛ
324	AIFDFCPSV	НМРЛ, КРК, РЖ, МЕЛ, ГБ, РП, ХЛЛ
325	RLLPKVQEV	РП, НМРЛ, КРК, МРЛ, РЯ
326	SLLPLVWKI	НМРЛ, КРК, ГБ, ПКК, МЕЛ, ХЛЛ, ТР
327	SIGDIFLKY	РЖ, ГБ, КРК, ПКК, НМРЛ
328	SVDSAPAAV	МРЛ, РЯ, РПЖ, РП, ПКК, НМРЛ, РМП
329	FAWEPFRDQV	МРЛ, ГКК
330	FLWPKEVEL	НМРЛ, РМЖ, МРЛ, РЯ, ХЛЛ, НХЛ
331	AIWKELISL	ГБ, КРК
332	AVTKYTSAK	ХЛЛ, НМРЛ, МЕЛ, НХЛ
333	GTFLEGVAK	ПКК, ХЛЛ, ГКК
334	GRADALRVL	РМЖ, МРЛ, ХЛЛ
335	VLLAAGPSAA	РМП, ХЛЛ, НМРЛ, РЖ, клРПЖ
336	GLMDGSPHFL	РПЖ, НМРЛ
337	KVLGKIEKV	ПКК, КРК
339	VLGPGPPPL	НМРЛ, клРПЖ, ХЛЛ, НХЛ
340	SVAKTILKR	НМРЛ, РП

В Таблице 8Б представлена презентация выбранных пептидов при дополнительных видах раковых заболеваний и, таким образом, особая значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных видов рака.

Таблица 8Б: Сводка данных презентации выбранных пептидов, связывающихся с молекулами HLA-A\*02 среди различных видов тканей. ГБ = глиобластома, РМЖ= рак молочной железы, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечноклеточная карцинома, ХЛЛ = хронический лимфоцитарный лейкоз, ГКК = гепатоклеточная карцинома, НМРЛ= немелкоклеточный рак

легких, МРЛ = мелкоклеточный рак легких, НХЛ = неходжкинская лимфома, ОМЛ = острый миелоидный лейкоз, РЯ = рак яичника, РПЖ = рак поджелудочной железы, РПрЖ = рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, РП = рак пищевода, в том числе желудочно-пищеводное соединение, РЖП\_ХК = аденокарцинома желчного пузыря и холангиокарцинома, МЕЛ = меланома, РЖ = рак желудка, РМП = рак мочевого пузыря, РМ = рак матки, ПлККГШ = плоскоклеточная карцинома головы и шеи.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
1	HLYNNEEQV	РЖП_ХК
2	ALYGKLLKL	клРПЖ, РМ, РПрЖ, МЕЛ, ОМЛ
3	TLLGKQVTL	ХЛЛ, НМРЛ, НХЛ, ОМЛ
5	SLFGQEVYC	РЖП_ХК, РПрЖ
6	FLDPAQRDL	МЕЛ
7	AAAAKVPEV	МЕЛ, ПлККГШ, НХЛ
8	KLGPFLNA	РМ, ГКК
9	FLGDYVENL	РМ, ОМЛ, РЯ, клРПЖ
12	GLIYEETRGV	ОМЛ, РМ, ПлККГШ
13	VLRDNIQGI	ОМЛ, ПлККГШ
17	ILHEHHIFL	РМ
18	YVLNEEDLQKV	РМ, НМРЛ
19	TLLPTVLT	РЖП_ХК, РМЖ, РМ
22	MLSDLTLQL	МЕЛ
24	FLWNGEDSAL	НМРЛ, РЖ, РМ
28	TLYSMDLMKV	ПлККГШ, ПКК
32	ILADEAFFSV	ПлККГШ, РМ, ОМЛ, РЖП_ХК
33	LLLPLLPPLSPSLG	МЕЛ, НМРЛ, РЖП_ХК, РЖ, клРПЖ, МРЛ, ГБ, РПЖ, ККМ, КРК, ГКК
34	LLPKKTESHHT	РМ
35	YVLPKLYVKL	ПлККГШ, НХЛ, ОМЛ
36	KLYGIEIEV	РМ
37	ALINDILGELVKL	МЕЛ, РМ
38	KMQEDLVTL	МЕЛ, ОМЛ
39	ALMAVVSGL	ПлККГШ, НХЛ, РМ, ОМЛ
40	SLLALPQDLQA	РЖП_ХК, РМЖ, РМ
41	FVLPLVVT	ОМЛ, КРК, РМЖ, ПлККГШ, РМ
42	VLSPFILTL	ОМЛ, ХЛЛ, РМ
43	LLWAGPVTA	ПлККГШ
45	VLGPTPELV	РП, РЖП_ХК, РМЖ
46	SLAKHGIVAL	РМ, ПлККГШ, ГБ, ХЛЛ, МЕЛ, РМ, ГКК

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
47	GLYQAQVNL	РП
50	EYALLYHTL	РЖП_ХК
51	LLLDGDFTL	РП
53	SLLSHVIVA	ГКК, ОМЛ, РЯ, РП, ПлККГШ, МЕЛ, ХЛЛ, НХЛ, РМЖ
54	FINPKGNWLL	РМ, ПлККГШ
55	IASAIVNEL	ГКК, РЖП_ХК
56	KILDLTRVL	РЖП_ХК
57	VLISSVRL	МЕЛ
59	ALTKILAEI	ГКК
60	FLIDTSASM	ОМЛ, ХЛЛ, РМЖ, ПлККГШ, РМ, НХЛ
61	HLPDFVKQL	МЕЛ, ОМЛ
64	GLSSSSYEL	РЖП_ХК, ГКК
65	KLDGICWQV	РЖП_ХК, ГКК
66	FITDFYTTV	МЕЛ, РМ, ГКК, ПлККГШ, КРК
67	GVIETVTSI	ОМЛ
70	GLFSQHFNL	РМЖ, РМ, ПлККГШ, РМП, ОМЛ, РП, клРПЖ
71	GLITVDIAL	ОМЛ, МЕЛ, РМ
72	GMIGFQVLL	ПлККГШ, ОМЛ
73	GVPDTIATL	РЖ
74	ILDETLENV	ОМЛ, РМЖ
75	ILDNVKNLL	ОМЛ
77	IVLSTIASV	ОМЛ
78	LLWGHPRVA	НМРЛ
79	SLVPLQILL	ГКК
80	TLDEYLYTL	ГКК
81	VLFLGKLLV	ПлККГШ
86	LLVTSLVVV	ГКК, РЖП_ХК
88	ILLNTEDLASL	ПКК
91	SSLEPQIQPV	МЕЛ, ХЛЛ
93	SLLTQPIFL	РЖП_ХК
321	SLWFKPEEL	РМ, ПлККГШ, ОМЛ
322	ALVSGGVAQA	ОМЛ, РЖ, клРПЖ, РМ, МЕЛ
323	ILSVVNSQL	МЕЛ, РЖП_ХК, ОМЛ, РП
324	AIFDFCPSV	РМЖ, НХЛ, РМ, ОМЛ, ПлККГШ
325	RLLPKVQEV	ОМЛ, РМЖ, РМП, РЖ
326	SLLPLVWKI	ОМЛ
327	SIGDIFLKY	МЕЛ, ОМЛ
328	SVDSAPAAV	НХЛ, РМЖ, ОМЛ, РМ, ХЛЛ, ПлККГШ, МЕЛ
329	FAWEPFRDQV	РЖП_ХК

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
330	FLWPKEVEL	ОМЛ
331	AIWKELISL	МЕЛ, ХЛЛ, НМРЛ
333	GTFLEGVAK	МЕЛ, НМРЛ
334	GRADALRVL	МЕЛ, РЖП_ХК, ОМЛ
335	VLLAAGPSAA	ОМЛ, КРК, РМ, НХЛ
336	GLMDGSPHFL	МЕЛ
338	LLYDGKLSSA	КРК, РМП, РЯ
339	VLGPGPPPL	МЕЛ, ГБ, РМ, ОМЛ, ГКК
340	SVAKTILKR	НХЛ

**Таблица 9А:** Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA-A\*24, настоящего изобретения по видам заболеваний. ГБ = глиобластома, ГКК = гепатоклеточная карцинома, НМРЛ = немелкоклеточный рак легких, РПрЖ = рак предстательной железы, РЖ = рак желудка, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечноклеточная карцинома.

SEQ ID NO.	Последовательность	ЗАБОЛЕВАНИЯ
96	LYSPVPFTL	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ
97	TYTFLKETF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, ГБ
98	VFPRLHNVLF	ГКК, НМРЛ, РЖ
99	QYILAVPVL	НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ
100	VYIESRIGTSTSF	ГБ, ГКК, НМРЛ, РЖ
101	IYIPVLPPhL	ГКК, НМРЛ
102	VYPFENFEF	РЖ, НМРЛ
103	NYIPVKNGKQF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, ГБ
104	SYLTWHQQI	РПрЖ, ГКК, НМРЛ
105	IYNETITDLL	РЖ, ГБ, ГКК, НМРЛ
106	IYNETVRDLL	РЖ, ГБ, НМРЛ
107	KYFPYLVVI	ГКК, НМРЛ, РЖ
109	LFITGGQFF	ГКК, НМРЛ, РЖ
110	SYPKIEEF	ГБ, ГКК, НМРЛ, РЖ
111	VYVQILQKL	РЖ, ГКК, НМРЛ
112	IYNFVESKL	НМРЛ, РЖ
113	IYSFHTLSF	НМРЛ, РЖ, ГБ
114	QYLDGTWSL	НМРЛ, РЖ, ГБ
115	RYLNKSFVL	НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ, ГКК
116	AYVIAVHLF	ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ
117	IYLSDLTYI	ГКК, НМРЛ, РЖ, РПрЖ
118	KYLNSVQYI	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ
119	VYRVYVTTF	НМРЛ, РЖ

120	GYIEHFSLW	ГКК, НМРЛ, РЖ
121	RYGLPAAWSTF	ГКК, НМРЛ, РЖ
122	EYQARIPEF	НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ, ГКК
123	VYTPVLEHL	НМРЛ, РЖ, ГБ, ГКК
124	TYKDYVDLF	РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ
125	VFSRDFGLLVF	РЖ, ГКК, НМРЛ
126	PYDPALGSPSRLF	НМРЛ, РЖ, РПрЖ, ГКК
127	QYFTGNPLF	НМРЛ, РЖ, ГБ, ПКК, РПрЖ
128	VYPFDWQYI	ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ
129	KYIDYLMTW	НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ, ГКК
130	VYAHYHQHF	НМРЛ, РЖ, РПрЖ, ГКК
131	EYLDRIQQLFF	НМРЛ, РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ, ГКК
132	RYPALFPVL	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ
133	KYLEDMKTYF	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ
134	AYIPTPIYF	РПрЖ, НМРЛ, ГБ
135	VYEAMVPLF	РЖ, НМРЛ
136	IYPEWPVVF	РЖ
137	EYLHNCSYF	РЖ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ
138	VYNAVSTSF	НМРЛ, РЖ
139	IFGIFPNQF	РПрЖ, НМРЛ
142	VYVDDIYVI	НМРЛ, РЖ
143	KYIFQLNEI	ГБ, НМРЛ
144	VFASLPGFLF	НМРЛ, РЖ
145	VYALKVRTI	НМРЛ
147	LYLAFPLAF	НМРЛ, РЖ, РПрЖ, ГКК
148	SYGTVSQIF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ
149	SYGTVSQI	ГКК, НМРЛ, ГБ
150	IYITRQFVQF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, ГБ
151	AYISGLDVF	ГКК, НМРЛ, РПрЖ
153	VYVPFGGKSMITF	НМРЛ
154	VYGVPTPHF	ГБ, НМРЛ
155	IYKWITDNF	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ
156	YYMELTKLLL	НМРЛ, РЖ, ГКК
157	DYIPASGFALF	НМРЛ, ГБ
158	IYEETRGLKVF	ГКК, НМРЛ, РЖ
159	IYEETRGL	ГКК, НМРЛ
160	RYGDGGSSF	РПрЖ, НМРЛ, РЖ
161	KYPDIVQQF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ
162	KYTSYILAF	НМРЛ, РЖ, РПрЖ, ГКК
163	RYLTISNLQF	НМРЛ
165	EYFTPLLSGQF	НМРЛ
166	FYTLPFHLI	ГКК, НМРЛ
168	RYLEAALRL	НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ, ГКК
169	NYITGKGDVF	НМРЛ, РПрЖ

170	QYPFHVPLL	РЖ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ
174	VYEKNGYIYF	НМРЛ, ГБ
175	YYTQYSQTI	ГБ, НМРЛ
176	FYINGQYQF	ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ
177	VYFKAGLDVF	РПрЖ, НМРЛ
178	NYSSAVQKF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, ГБ
179	TYIPVGLGRLL	НМРЛ, РЖ
180	KYLQVVGFM	НМРЛ, ГБ
182	AYAQLGYLLF	НМРЛ
183	PYLQDVPRI	НМРЛ, ГБ
186	VFTTSSNIF	НМРЛ, ГБ
187	AYAANVHYL	НМРЛ
188	GYKTFFNEF	НМРЛ
192	RYSTFSEIF	ГКК, НМРЛ, РЖ
194	VYQSLSNSL	НМРЛ
195	AYIKGGWIL	ПКК, ГКК, НМРЛ, РЖ
196	GYIRGSWQF	НМРЛ, РЖ
197	IFTDIFHYL	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ
199	SYLNHLNNL	НМРЛ
201	GYNPNRVFF	ГБ, НМРЛ
202	RYVEGIVSL	НМРЛ
204	EYLSTCSKL	НМРЛ, ГКК
206	NYLDVATFL	НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ, ГКК
207	LYSDAFKFIVF	НМРЛ
209	AFIETPIPLF	НМРЛ
210	IYAGVGEFSF	НМРЛ, РЖ
215	SYVASFLL	РЖ, НМРЛ
217	IYISNSIYF	НМРЛ, РЖ
221	KYIGNLDLL	НМРЛ, ГБ
223	TFITQSPLL	НМРЛ
225	TYTNTLERL	НМРЛ
226	MYLKLVLQF	ГКК, РЖ
228	IYQYVADNF	НМРЛ
229	IYQFVADSF	НМРЛ
232	YYLSDSPLL	НМРЛ, РЖ
234	SYLPAIWLL	РЖ
235	VYKDSIYYI	ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ
236	VYLPKIPSW	ГКК, НМРЛ
238	SYLEKVRQL	НМРЛ
240	YYFFVQEKI	ГКК, НМРЛ
243	SYLELANTL	РПрЖ, НМРЛ
248	AFPTFSVQL	НМРЛ
249	RYHPTTCTI	НМРЛ
250	KYPDIASPTF	ГКК
251	VYTKALSSL	НМРЛ, ГКК
252	AFGQETNVPLNNF	ГКК

253	IYGFFNENF	ГКК
254	KYLESSATF	НМРЛ
255	VYQKILKF	ГКК
257	IFIDNSTQPLHF	ГКК
259	YFIKSPPSQLF	НМРЛ, РЖ
260	VYMNVMTRL	НМРЛ
261	GYIKLINFI	РЖ
262	VYSSQFETI	ГБ
264	LYTETRLQF	НМРЛ
265	SYLNEAFSF	РПрЖ
266	KYTDWTEFL	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ
268	IFITKALQI	РЖ
269	QYPYLQAFF	НМРЛ
271	RFLMKSYSF	ГКК
274	KQLDIANYELF	НМРЛ, ГБ, ГКК
275	KYGTLDVTF	НМРЛ
276	QYLDVLHAL	РЖ, ПКК
277	FYTFPFQQL	РЖ, ПКК, РПрЖ, ГКК, НМРЛ
280	TYNPNLQDKL	ГКК
281	NYSPGLVSLIL	НМРЛ
284	DYLKDPVTI	НМРЛ
285	VYVGDALLHAI	РПрЖ
286	SYGTILSHI	НМРЛ
288	VYPDTVALTF	НМРЛ, РЖ
289	FFHEGQYVF	РЖ
290	KYGDfKLLEF	РПрЖ, ГБ
295	SYLVIHERI	НМРЛ, РЖ
296	SYQVIFQHF	НМРЛ, РЖ
297	TYIDTRTVF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ
298	AYKSEVVYF	НМРЛ, ГБ
299	KYQYVLNEF	НМРЛ, РЖ, ГБ
300	TYPSQLPSL	КРК, РЖ
301	KFDDVTMLF	НМРЛ, РЖ, ГКК
303	LYSVIKEDF	ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ
304	EYNEVANLF	ГКК, НМРЛ, РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ
305	NYENKQYLF	НМРЛ, ГБ, ГКК
306	VYPAEQPQI	НМРЛ
307	GYAFTLPLF	НМРЛ, РЖ
308	TFDGHGVFF	НМРЛ, РЖ
309	KYYRQTLLF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ
310	IYAPTLLVF	РЖ, ГБ, ПКК, ГКК, НМРЛ
311	EYLQNLNHI	РПрЖ
312	SYTSVLSRL	РПрЖ, ГКК, НМРЛ
313	KYTHFIQSF	НМРЛ, РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ, ГКК

314	RYFKGDYSI	ГБ, ГKK
315	FYIPHVPVSF	ГKK, HMPJ
316	VYFEGSDFKF	ГБ, PПpЖ, ГKK, HMPJ
317	VFDTZIAQLF	ГБ, ПKK, ГKK, HMPJ, PЖ
318	TYSNSAFQYF	PЖ, ПKK, PПpЖ, ГKK, HMPJ
319	KYSDVKNLI	PПpЖ, ГKK, HMPJ, ГБ
320	KFILALKVLF	ГKK, HMPJ
341	SYLTQHORI	PПpЖ, HMPJ
343	NYLGGTSTI	PПpЖ, ГKK, ГБ
344	EYNSDLHQF	ГБ, ПKK, ГKK, HMPJ, PЖ
345	EYNSDLHQFF	ГБ, HMPJ
346	IYVIPQPHF	HMPJ, PЖ, ГБ, ГKK
347	VYAEVNSL	ГБ, HMPJ, PЖ
348	IYLEHTESI	PЖ, ГKK, HMPJ
349	QYSIISNVF	PЖ, ГKK, HMPJ
350	KYGNFIDKL	HMPJ, PЖ, ГKK
351	IFHEVPLKF	ГKK, HMPJ
352	QYGGDLTNTF	HMPJ, ГБ
353	TYGKIDLGF	ГKK, HMPJ, PЖ, ГБ
354	VYNEQIRDLL	HMPJ, PЖ, ГБ
355	IYVTGGHLF	ГKK, HMPJ, PЖ, ПKK, ГБ, PПpЖ
356	NYMPGQLTI	ПKK, HMPJ, PЖ
357	QFITSTNTF	HMPJ
358	YYSEVPVKL	HMPJ, ГБ
359	NYGVLHVTF	ПKK, ГKK, HMPJ
360	VFSPDGHLF	ГБ, PПpЖ, ГKK, HMPJ
361	TYADIGGLDNQI	PПpЖ, HMPJ, PЖ, ГБ, ПKK
362	VYNYAEQTL	PЖ, ГБ, HMPJ
363	SYAELGTTI	ГБ, HMPJ, PЖ
365	VFIDHPVHL	HMPJ, ГБ
366	QYLELAHSL	ГKK, HMPJ, PЖ
367	LYQDHMQYI	ГKK, HMPJ, PЖ, ГБ, PПpЖ
368	KYQNVKHNL	HMPJ, ГKK
369	VYTHEVVTL	HMPJ
370	RFIGIPNQF	PПpЖ
371	AYSHLRYVF	ГБ, PПpЖ, ГKK, HMPJ
373	GYISNGELF	PПpЖ, ГKK
375	KYTDYILKI	HMPJ
376	VYTPVASRQSL	ГKK, HMPJ, PЖ, ГБ, PПpЖ
377	QYTPHSHQF	ГKK, HMPJ
378	VYIAELEKI	ГKK, HMPJ
380	VYTGIDHHW	HMPJ, PЖ, ПKK, ГБ, PПpЖ, ГKK
382	AYLPPLQQVF	PПpЖ, ГKK, HMPJ, PЖ, ПKK, ГБ

383	RYKPGEPITF	ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ
384	RYFDVGLHNF	РЖ, ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ
385	QYIEELQKF	НМРЛ, ГКК
386	TFSDVEAHF	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ
387	KYTEKLEEI	ГКК, НМРЛ, РЖ, РПрЖ
388	IYGEKTYAF	ГКК, НМРЛ, РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ
389	EYLPEFLHTF	НМРЛ
390	RYLWATVTI	РЖ, ГКК, НМРЛ
391	LYQILQGIVF	НМРЛ, РЖ, ГБ, ПКК, ГКК
392	RYLDSLKAIVF	НМРЛ, РЖ, ПКК, ГКК
393	KYIEAIQWI	ГКК, НМРЛ
394	FYQPKIQQF	ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ, РЖ
395	LYINKANIW	НМРЛ, РЖ, ГКК
396	YYHFIFTTL	ГБ
397	IYNGKLFDL	ГБ, НМРЛ, РЖ
398	IYNGKLFDLL	КРК, РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ, ГКК, НМРЛ
399	SYIDVLPEF	ГКК, НМРЛ, РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ
400	KYLEKYYNL	НМРЛ
401	VFMKDGFFYF	НМРЛ, РЖ, РПрЖ
402	VWSDVTPLTF	НМРЛ, КРК, РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ, ГКК
403	TYKYVDINTF	НМРЛ, РЖ
404	RYLEKFYGL	НМРЛ, РЖ, ГКК
405	NYPKSIHSF	НМРЛ
406	TYSEKTLF	НМРЛ, РЖ
407	VYGIRLEHF	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ
408	QYASRFVQL	РЖ, ГБ, ГКК, НМРЛ
409	YFISHVLAF	РЖ, НМРЛ
410	RFLSGIINF	НМРЛ, РЖ, ГБ, ГКК
411	VYIGHTSTI	НМРЛ
412	SYNPLWLRI	ГБ, ПКК, ГКК, НМРЛ, РЖ
413	NYLLYVSNF	ГКК, НМРЛ, РЖ
414	MYPYIYHVL	ГКК, НМРЛ, РЖ, ГБ, РПрЖ
415	SYQKVIELF	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, КРК, РЖ, ПКК, ГБ
416	AYSDBGHFLF	НМРЛ, РЖ, ПКК, ГБ, РПрЖ, ГКК
417	VYKVVGNNL	ГБ, ПКК, ГКК, НМРЛ, РЖ

В Таблице 9Б представлена презентация выбранных пептидов при дополнительных видах раковых заболеваний и, таким образом, особая значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных видов рака.

Таблица 9Б: Сводка данных презентации выбранных пептидов, связывающихся с молекулами HLA-A\*24, среди различных видов рака. ГБ = глиобластома, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечноклеточная карцинома, ГКК = гепатоклеточная карцинома, НМРЛ = немелкоклеточный рак легких, РПрЖ = рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, РЖ = рак желудка.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
50	EYALLYHTL	РПрЖ, ГКК, НМРЛ, КРК, РЖ, ПКК
104	SYLTWHQQI	ГБ
108	PYLVVIHTL	НМРЛ
110	SYPKIEEF	РПрЖ
132	RYPALFPVL	ПКК
135	VYEAMVPLF	ГКК
140	RYLINSYDF	НМРЛ
141	SYNGHLTIWF	ГБ
146	NYYERIHAI	НМРЛ
148	SYGTVSQIF	КРК
152	KFFDDLGDLELF	НМРЛ
155	IYKWITDNF	РПрЖ
164	HYVPATKVF	НМРЛ
167	RYGFYYVEF	ГБ
171	NYEDHFPLL	НМРЛ
172	VFIFKGNEF	НМРЛ
173	QYLEKYYNL	НМРЛ
181	VYPPYLNLY	РПрЖ
184	IYSVGAFENF	НМРЛ
185	QYLVHVNDL	ГБ
189	AYFKQSSVF	НМРЛ
190	LYSELTETL	НМРЛ
191	TYPDGTYTGRIF	НМРЛ
193	LYLENNAQTQF	НМРЛ
198	DYVGFTLKI	НМРЛ
200	VFIHLPQF	ГКК
203	VYNVEVKNAEF	НМРЛ
204	EYLSTCSKL	РПрЖ
205	VYPVVLNQI	НМРЛ
208	TYLEKIDGF	НМРЛ
211	VFKSEGAYF	НМРЛ
212	SYAPPSEDLF	НМРЛ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
213	SYAPSEDLFL	НМРЛ
214	KYLMELTLI	НМРЛ
216	FYVNVKEQF	НМРЛ
218	LYSELNKWSF	НМРЛ
219	SYLKAVFNL	НМРЛ
220	SYSEIKDFL	НМРЛ
222	HYSTLVHMF	НМРЛ
224	PYFFANQEF	ГКК
227	IYRFITERF	НМРЛ
230	TYGMVMVTF	НМРЛ
231	AFADVSVKF	НМРЛ
233	QYLTAALHNL	НМРЛ
237	KYVGQLAVL	ГКК
239	VYAIFRILL	РЖ
241	SYVKVLHHL	ГКК
242	VYGEPRELL	ГКК
244	VHFEDTGKTLLF	НМРЛ
245	LYPQLFVVL	РЖ
246	KYLSVQLTL	НМРЛ
247	SFTKTSPNF	ГКК
256	VFGKSAYLF	НМРЛ
258	AYAQLGYLL	НМРЛ
263	RYILENHDF	ГКК
267	SFLNIEKTEILF	ГКК
270	YYSQESKVLYL	ГКК
272	RYVFPLPYL	НМРЛ
273	IYGEKLQFIF	НМРЛ
278	KYVNLVMYF	НМРЛ
279	VWLPASVLF	НМРЛ
282	NYLVDPVTI	НМРЛ
283	EYQEIFQQL	НМРЛ
287	IYNPNLLTASKF	НМРЛ
291	YYLGSGRETF	НМРЛ, ГБ, РПРЖ, ГКК
292	FYPQIINTF	НМРЛ
293	VYPHFSTTNLI	ГКК
294	RFPVQGTVTF	РПРЖ
302	LYLPVHYGF	НМРЛ
342	NYAFLHRTL	НМРЛ
344	EYNSDLHQF	РПРЖ
348	IYLEHTESI	ГБ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
350	KYGNFIDKL	РПрЖ
364	KYLNENQLSQL	НМРЛ
372	VYVIEPHSMEF	НМРЛ
374	VFLPRVTEL	НМРЛ
379	VFIAQGYTL	НМРЛ
381	KYPASSSVF	ПКК, НМРЛ

#### 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, и высокое соотношение экспрессии генов в опухоли к нормальной ткани указывает на наличие терапевтического окна. Более того, избыточная экспрессия исходных генов в видах опухолей, которые до сих пор не были проанализированы относительно презентации пептидов, указывает на то, что определенный пептид может иметь значение для соответствующего вида.

Для пептидов по изобретению, связывающихся с молекулами HLA I класса, экспрессия в нормальных тканях всех исходных генов минимальна, как было показано, руководствуясь данными банка данных о последовательностях РНК (RNASeq), охватывающего прилб. 3000 образцов нормальных тканей (Lonsdale, 2013). Более того, чтобы оценить целевой охват в различных видах опухолей, были проанализированы данные об экспрессии генов в опухолях по сравнению с нормальными тканями.

##### 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, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Istituto Nazionale Tumori «Pascale» (Неаполь, Италия); Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия); компаний BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия), BioServe (Белтсвилл, Мэриленд, США), Capital BioScience Inc. (Роквилл, Мэриленд, США).

Суммарная РНК опухолевых тканей для экспериментов RNASeq была получена из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США), BioServe (Белтсвилл, Мэриленд, США), 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. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, 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 CeGaT (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

эквимолярном соотношении и секвенировали на системе компании Illumina HiSeq 2500 согласно инструкциям производителя, получая одиночные риды длиной 50 пар оснований. Обработанные риды картируют на человеческий геном (GRCh38) с помощью программного обеспечения STAR. Данные по экспрессии представляются 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 при различных видах рака, представлены на Фигуре 2. Показатели экспрессии других типичных мишеней показаны в Таблице 10 (А и Б) на основании собственных данных, полученных в ходе анализа данных RNASeq. Данные о экспрессии для других видов заболеваний и дополнительных типичных пептидов сведены в Таблицу 11, информация основана на данных, полученных с помощью исследовательской сети TCGA (Атлас ракового генома): <http://cancergenome.nih.gov/>.

**Таблица 10А:** Целевой охват при различных опухолевых заболеваниях относительно экспрессии исходных генов выбранных пептидов. Избыточной считали экспрессию на опухоли, которая была в 1,5 раза выше в сравнении с соответствующей нормальной тканью, демонстрировавшей наивысшую экспрессию гена. Избыточная экспрессия <19% = I, 20-49% = II, 50-69% = III, >70% = IV. Если пептид мог быть получен из нескольких исходных генов, решающее значение имел ген с наименьшим покрытием. Фоновый уровень включал следующие релевантные нормальные ткани: жировая ткань, надпочечник, артерия, костный мозг, головной мозг, хрящевая ткань, толстая кишка, пищевод, желчный пузырь, сердце, почка, печень, легкие, лимфатический узел, поджелудочная железа, гипофиз, прямая кишка, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, вилочковая железа, щитовидная железа, трахея, мочевого пузырь и вена. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов.



SEQ ID NO.	Последовательность	ОМЛ (N=7)	РМЖ (N=10)	ХЛЛ (N=10)	КРК (N=20)	ГБ (N=24)	ГКК (N=15)	пНМРЛ(N=11)	РЯ (N=12)	РП (N=11)	РПЖ (N=26)	ПКК (N=10)	МРЛ (N=10)
69	GIYDGIHLSI	I	I	I	II	II	II	II	II	II	I	I	II
70	GLFSQHFNL	III	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
73	GVPDTIATL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I
75	ILDNVKNLL	IV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
78	LLWGHPRVA	I	IV	I	II	I	I	III	III	IV	III	I	I
79	SLVPLQILL	I	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I
80	TLDEYLTYL	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	I
81	VLFLGKLLV	I	I	II	II	III	II	I	II	II	II	II	IV
84	FLEEEITRV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
86	LLVTSLVVV	I	I	I	I	I	III	I	I	I	I	I	I
88	ILLNTEDLASL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	II
91	SSLEPQIQPV	I	II	II	I	II	I	I	II	III	I	II	I
322	ALVSGGVAQA	I	III	I	I	I	I	I	III	III	II	I	I
323	ILSVVNSQL	I	I	IV	II	I	I	I	I	I	I	I	I
324	AIFDFCPSV	I	I	IV	I	I	I	I	I	I	I	I	I
325	RLLPKVQEV	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
327	SIGDIFLKY	I	II	I	III	II	I	IV	III	III	II	I	IV
328	SVDSAPAAV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
329	FAWEPSFRDQV	I	I	I	I	I	III	I	I	I	I	I	I
331	AIWKELISL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	III
332	AVTKYTSK	I	II	I	I	I	II	I	I	I	I	I	II
334	GRADALRVL	I	I	IV	I	I	I	I	I	I	I	I	I
335	VLLAAGPSAA	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	II
336	GLMDGSPHFL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
337	KVLGKIEKV	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
338	LLYDGLSSA	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
96	YYTQYSQTI	I	IV	I	II	I	I	III	III	IV	III	I	I
98	VFRLHNVLF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
100	VYIESRIGTSTSF	I	II	I	I	I	I	I	II	II	I	I	II
101	IYIPVLPPL	I	IV	I	I	I	I	IV	III	III	I	I	I
103	NYIPVKNGKQF	I	I	III	I	I	I	I	I	I	I	I	I
106	IYNETVRDLL	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I	I
107	KYFPYLVVI	I	II	I	I	I	I	I	II	III	I	II	I
108	PYLVVIHTL	I	II	I	I	I	I	I	II	III	I	II	I
110	SYPKIIIEF	I	I	III	I	I	I	I	I	I	I	I	I
113	IYSFHTLSF	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	III
114	QYLDGTWSL	I	IV	I	II	II	I	IV	II	IV	III	I	II
115	RYLNKSFVL	I	II	I	II	I	I	I	III	I	I	I	II



SEQ ID NO.	Последовательность	ОМЛ (N=7)	РМЖ (N=10)	ХЛЛ (N=10)	КРК (N=20)	ГБ (N=24)	ГКК (N=15)	пНМРЛ(N=11)	РЯ (N=12)	РП (N=11)	РПЖ (N=26)	ПКК (N=10)	МРЛ (N=10)
185	QYLVHVNDL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	II	II
189	AYFKQSSVF	II	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
190	LYSELTETL	IV	III	IV	I	II	I	IV	I	I	II	I	IV
191	TYPDGTYTGRIF	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
193	LYLENNAQTQF	I	I	I	I	I	I	II	I	IV	I	I	I
195	AYIKGGWIL	I	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I
198	DYVGFTLKI	I	I	I	I	III	I	II	I	I	I	I	I
203	VYNVEVKNAEF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
204	EYLSTCSKL	II	II	I	I	I	I	I	II	I	I	I	III
205	VYPVVLNQI	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
206	NYLDVATFL	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	I	II
208	TYLEKIDGF	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
210	IYAGVGEFSF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
211	VFKSEGAYF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
212	SYAPSEDLF	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
213	SYAPSEDLFL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
214	KYLMELTLI	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
216	FYVNVKEQF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
218	LYSELNKWSF	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I
219	SYLKAVFNL	I	III	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
220	SYSEIKDFL	I	I	IV	I	I	I	I	I	I	I	I	I
221	KYIGNLDLL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I
222	HYSTLVHMF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I
224	PYFFANQEF	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
226	MYLKLVLQF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
227	IYRFITERF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
230	TYGMVMVTF	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
231	AFADVSVKF	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
233	QYLTAALHNL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
235	VYKDSIYYI	II	I	IV	I	I	I	I	I	I	I	I	I
236	VYLPKIPSW	I	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I
237	KYVGQLAVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
239	VYAIRILL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
240	YYFFVQEKI	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
241	SYVKVLHHL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
242	VYGEPRELL	I	II	I	I	I	II	I	I	I	I	I	II
243	SYLELANTL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
244	VHFEDTGKTLF	I	II	I	I	I	I	II	I	III	I	I	I



SEQ ID NO.	Последовательность	ОМЛ (N=7)	РМЖ (N=10)	ХЛЛ (N=10)	КРК (N=20)	ГБ (N=24)	ГКК (N=15)	пНМРЛ(N=11)	РЯ (N=12)	РП (N=11)	РПЖ (N=26)	ПКК (N=10)	МРЛ (N=10)
348	IYLEHTESI	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
350	KYGNFIDKL	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I	I
351	IFHEVPLKF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
352	QYGGDLTNTF	I	I	I	I	I	I	II	I	I	II	I	I
353	TYGKIDLGF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
354	VYNEQIRDLL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
355	IYVTGGHLF	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
356	NYMPGQLTI	I	I	I	II	I	I	II	II	I	II	II	I
358	YYSEVPVKL	I	IV	I	II	I	I	III	III	IV	III	I	I
359	NYGVLHVTF	II	I	II	II	II	III	I	I	I	I	II	II
360	VFSPDGHLF	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
361	TYADIGGLDNQI	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
363	SYAELGTTI	I	I	I	I	II	I	I	I	II	I	I	I
364	KYLNENQLSQL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III
365	VFIDHPVHL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	II
366	QYLELAHSL	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I	II
367	LYQDHMQYI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
368	KYQNVKHNL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
371	AYSHLRYVF	I	I	I	IV	III	I	IV	II	IV	III	III	II
372	VYVIEPHSMEF	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	II
374	VFLPRVTEL	I	III	I	II	III	I	III	III	II	I	I	IV
376	VYTPVASRQSL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	II
377	QYTPHSHQF	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	I	III
378	VYIAELEKI	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
379	VFIAQGYTL	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	II	II
380	VYTGIDHHW	I	II	I	II	I	I	II	III	IV	I	I	III
381	KYPASSVF	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	III	I
382	AYLPPLQQVF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
383	RYKPGEPITF	II	IV	I	II	I	I	IV	II	II	I	I	II
385	QYIEELQKF	I	I	IV	I	I	I	I	I	I	I	I	I
386	TFSDVEAHF	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II
387	KYTEKLEEI	I	I	I	I	IV	I	I	II	I	I	I	III

Таблица 10Б: Целевой охват для исходных генов выбранных пептидов. Избыточной считали экспрессию на опухоли, которая была в 1,5 раза выше в сравнении с соответствующей нормальной тканью, демонстрировавшей наивысшую экспрессию гена. Избыточная экспрессия <19% = I, 20-49% = II, 50-69% = III, >70% = IV. Если пептид мог быть получен из



SEQ ID NO.	Последовательность	HXL (N=10)	PPrЖ (N=10)	PЖ (N=11)	PЖП_XK (N=10)	MEJ (N=10)	PMI (N=10)	PM (N=10)	ПлККГП (N=10)
53	SLLSHVIVA	III	I	I	II	I	I	II	I
55	IASAIVNEL	II	I	I	II	I	I	I	I
60	FLIDTSASM	I	I	I	I	I	I	I	I
61	HLPDFVKQL	I	I	I	I	I	I	I	I
70	GLFSQHFNL	I	I	I	II	I	II	III	II
96	YYTQYSQTI	I	I	I	II	I	I	I	II
98	VFPRLHNVLF	I	I	I	I	I	I	I	I
99	QYILAVPVL	I	I	I	I	I	I	I	I
100	VYIESRIGTSTSF	I	I	I	I	II	I	I	I
101	IYIPVLPPhL	III	III	I	III	I	II	III	III
103	NYIPVKNGKQF	I	I	I	I	I	I	I	I
104	SYLTDWHQOI	I	I	I	I	I	I	I	I
105	IYNETITDLL	I	I	I	I	I	I	I	I
110	SYPKIIEEF	II	I	I	I	I	I	I	I
113	IYSFHTLSF	I	I	I	I	I	I	I	II
114	QYLDGTWSL	II	I	II	IV	IV	III	IV	III
116	AYVIAVHLF	I	I	I	I	I	I	I	I
117	IYLSDLTYI	II	I	I	I	I	I	I	I
118	KYLNSVQYI	II	I	I	I	I	I	I	I
119	VYRVYVTTF	I	I	I	I	I	I	II	I
121	RYGLPAAWSTF	I	I	I	I	I	I	I	I
123	VYTPVLEHL	II	I	I	I	II	I	I	I
124	TYKDYVDLF	II	I	I	I	II	I	I	I
126	PYDPALGSPSRLF	I	II	II	II	I	I	III	I
127	QYFTGNPLF	I	I	I	I	I	I	I	I
128	VYFPDWQYI	I	I	I	I	I	I	I	I
132	RYPALFPVL	I	I	I	I	I	I	I	I
135	VYEAMVPLF	I	I	I	I	I	I	I	I
144	VFASLPGFLF	III	I	I	I	I	I	I	I
145	VYALKVRTI	II	I	I	II	II	II	I	II
147	LYLAFPLAF	I	I	I	I	I	I	I	I
150	IYITRQFVQF	I	I	I	I	II	I	I	I
151	AYISGLDVF	I	I	I	I	I	I	I	III
155	IYKWITDNF	I	I	I	I	I	I	II	I
156	YYMELTKLLL	II	I	I	II	I	I	I	I









SEQ CD NO.	АКР(N=79)	УКМП(N=40) 91	ПКШМ(N=30) 71	ХГК(N=36)	ДВКЛ(N=48)	ПлККГШ(N=5211)	ХКП(N=66)	ППККП(N=2011)	ГНС3(N=534)	МЕЗО(N=87)	ФХПГ(N=184)	АПрЖ(N=498)	САРК(N=263)	МК(N=473)	АКЖ(N=415)	ГГОЯ(N=156)	КЦЗ(N=513)	ТИМ(N=120)	ЭКТМ(N=546)	КСМ(N=57)	УВМ(N=80)	
4		В	С		В	В							С		С	А			С	С		
5																						
6																						
8	С								С			С										
9																						
10																						
11	С	В	В	В	А	С	С		С	С	В	А	С	В	В	В	С	А	А	В	С	
12	С	В	В	В	А	С	С		С	С	В	А	С	В	В	В	С	А	А	В	С	
13	С	В	В	В	А	С	С		С	С	В	А	С	В	В	В	С	А	А	В	С	
1		С	В		В	С							С	С	В	А		В	С	В		
17							В	А		С				С	С		А				В	
18							В	А		С				С	С		А				В	
21											С	В										
22											С	В										
24			С												С				С			
27													С									
28													С									
29															С							
30															С							
31		С	С			В							С	С	В	В				В	С	
32		С	С			В							С	С	В	В				В	С	
34		С	С		В										С	В		В	В	С		
35																			В			
36				С				С	В	С	С		С									
37																						
38											С											
39				С	В										С							
40		С	С	А		С				С	С				С	А	А	С	В	А		
42		А	А		В	В	В	С		С			С	С	С		С	А	С			
45															В							



SEQ CD NO.	АКР(N=79)	УКМП(N=40) 91	ПКШМ(N=30) 71	ХГК(N=36)	ДВКЛ(N=48)	ПлККГШ(N=5211)	ХКП(N=66)	ППККП(N=2011)	ГНС3(N=534)	МЕЗО(N=87)	ФХПГ(N=184)	АПрЖ(N=498)	САРК(N=263)	МК(N=473)	АКЖ(N=415)	ГГОЯ(N=156)	КЦЗ(N=513)	ТИМ(N=120)	ЭКТМ(N=546)	КСМ(N=57)	УВМ(N=80)	
86																						
87					С							С										
88				С							А										В	
90	С							С					В	А		С						А
91			С	С												С					С	
92		В	С			С		С					С	С						С		
321	В	В	С	С	В	В		С	А	В	В	С	В	В		С		В	В	В	В	В
323					В																	
325		С	В		С	В			А			С			В	С				В	С	
326														А			С	С				С
327		В	А	С		А				С			В	С	А	А				В	В	
328		С	В		С	С							С		В	А		С	С	С	В	
329																						
330		С	С	С	А				С	С	А			С	С	А		А	С	С		
331																В						
332	С	В	А	В	В	В	С			В		А	В	В	В	А	С	В	А	В	В	В
334					А								С	С		С		С				
335		В	А	С	А	С				С		С	С	В	В	С		А	В	С		
336																						
340					В		В									С						
175		С	С			В							С		С							
97																С						
98					С	С								В	С	В			В			
100	С	В	А		С	В				В			В	В	В	А		В	В	А		
101																						
103																						
104																						
105		В	А		В	В							В	С	А	В		В	С	В		
106		В	А		А	В							В	В	С	А		А	В	А		

SEQ CD NO.	АКР(N=79)	УКМП(N=40) 91	ПКШМ(N=30) 71	ХГК(N=36)	ДВКЛ(N=48)	ПлККГШ(N=5211)	ХКП(N=66)	ППККП(N=2011)	ГНС3(N=534)	МЕЗО(N=87)	ФХПГ(N=184)	АПрЖ(N=498)	САРК(N=263)	МК(N=473)	АКЖ(N=415)	ГГОЯ(N=156)	КЦЗ(N=513)	ТИМ(N=120)	ЭКТМ(N=546)	КСМ(N=57)	УВМ(N=80)	
107			С			В																
108			С			В																
110		В	А		А	С				С			С	В	С	А		В	В	В		
111		С	А		В	В							С	С	С	А		В	С			
112		С	А		В	В							С	С	С	А		В	С			
113																В						
114		С		В	С	С			С	С			В	В	В	С		С	С	С	С	С
115															С							
116								В	В		А	В	С			В	А	В	С	С		
117				С	В										С							
118				С	В										С							
119		С																				
121					А								С	С		С		С				
122																						
123		С	С			В							С	С	В	В				В	С	
124		С	С			В							С	С	В	В				В	С	
125		С	С			В							С	С	В	В				В	С	
126			С							С	С	В	С		В	В			В			
127																					С	
128					С							В				С						
129					В		В								С							
130					В		В								С							
131	В																					
132													С		С							
133						С																
134					В				С			В	С	С		В		А	С	В	В	
135						С	С								С	С						
136															С							
137																						
138		В	А	С	В	В			С				С	С	А	А		В	С	В		

SEQ CD NO.	АКР(N=79)	УКМП(N=40) 91	ПКШМ(N=30) 71	ХГК(N=36)	ДВКЛ(N=48)	ПлККГШ(N=5211)	ХКП(N=66)	ППККП(N=2011)	ГНС3(N=534)	МЕЗО(N=87)	ФХПГ(N=184)	АПрЖ(N=498)	САРК(N=263)	МК(N=473)	АКЖ(N=415)	ГГОЯ(N=156)	КЦЗ(N=513)	ТИМ(N=120)	ЭКТМ(N=546)	КСМ(N=57)	УВМ(N=80)	
139							В					С	В									
140																						
141																						
142		С	В		В	В			С				В	С	А	А		С	С			
144					С										С							
145					С	С									С	С		В				
146					В										С							
147															С							
148										С												
149										С												
150														С			А					
151			С			А			В													
152			С			А			В													
153																						
155			С																	В	С	
156	С	С	А		А	В							С	С	С	В		В	С	С		
157	В								В		С							С				
158	С	В	В	В	А	С	С		С	С	В	А	С	В	В	В	С	А	А	В	С	
159	С	В	В	В	А	С	С		С	С	В	А	С	В	В	В	С	А	А	В	С	
161					С													В				
162		С	В		А	С				С			С	В	С	В		С	С			
164		В	В	С	А	В		В		В			В	В	В	А	С	С	А	В		
165															С							
166															С							
167									С				С	В								
168		С								С			В		С	С			С	А		
169																						
170			С	С	А	С				С			С	С	С	В		В				
171		В	С			С								В	С	С			С	С		
172		С	В			А						С							С	С		



SEQ CD NO.	АКР(N=79)	УКМП(N=40) 91	ПКШМ(N=30) 71	ХГК(N=36)	ДВКЛ(N=48)	ПлККГШ(N=5211)	ХКП(N=66)	ППККП(N=2011)	ГНС3(N=534)	МЕЗО(N=87)	ФХПГ(N=184)	АПрЖ(N=498)	САРК(N=263)	МК(N=473)	АКЖ(N=415)	ГГОЯ(N=156)	КЦЗ(N=513)	ТИМ(N=120)	ЭКТМ(N=546)	КСМ(N=57)	УВМ(N=80)	
205									С												С	
206						С									С							
207			С			С	С		С													
208						С			С					В	С	А						С
209														В		С						
210		В	А		В	В			С	С			В	В	В	А		В	В	В		
211	В	В	А		В	С			С	С			А	В	В	А		В	В	А		
212														С			С					
213														С			С					
214		В	А		В	В				С			В	С	В	А		А	С	В		
216	С	В	А		В	В			С				В	В	С	В		В	С	В		
217														С								
218		С						С														
219		С	С																	С	С	
220															С			В				
221	В													С						С		
222	В													С						С		
223												С										
224																В						
225	С								С					С		С					С	
226	С	В	А	С	А	В							В	В	А	А		С	В	В		
227			С													С					С	
228							А															
229						С										А						
230	В								В		С										С	
231	В								В		С										С	
232	С	В	А	С	А	В			С	С			В	А	В	А		А	В	А		
233		В	С			В																
234		С	С												С	С				С		
235					А											С						







SEQ CD NO.	АКР(N=79)	УКМП(N=40) 91	ПКШМ(N=30) 71	ХГК(N=36)	ДВКЛ(N=48)	ПлККГШ(N=5211)	ХКП(N=66)	ППККП(N=2011)	ГНС3(N=534)	МЕЗО(N=87)	ФХПГ(N=184)	АПрЖ(N=498)	САРК(N=263)	МК(N=473)	АКЖ(N=415)	ГГОЯ(N=156)	КЦЗ(N=513)	ТИМ(N=120)	ЭКТМ(N=546)	КСМ(N=57)	УВМ(N=80)	
366	C	B	A	C	B	B							C	B	A	A		C	B	A	C	
367																						
368																C						
369	C	B	A		B	B							B	C	B	C		B	B	B		
371						C		B					C		C							
372		B	A	C	A	C				C		C	C	B	B	C		A	B	C		
373									C													
374		C	C			B							C	C	B	B					B	C
375										B			C									
376		C	C		C	C				C			C	B	C	B						
377	C												C									
378		C	A			C								C	C	C				C	C	
379						C																
380		C	C			C							C	C	C	B				C	B	C
382																C						
383																						
385				C	B										C							
386			C		C	C							C		B	B				C	C	
387									B		B		C	C		C						
388						C																
389		C	B			B											C	C				
390	C	B	A	C	B	B				A			B	B	A	A		B	C	B		
391	C	B	A		B	B							B	C	B	C		B	B	B		
392	B	B	A	C	B	B				C		A	B	B	B	A		B	C	B		
393														C			A					
394		B	A	C	A	B			C	C			B	B	B	A		A	B	B		
395													C		C	B						
396									A		B		C	C								C
397		A	A	C	A	A			C	C			B	B	B	A		A	B	A		
398		A	A	C	A	A			C	C			B	B	B	A		A	B	A		

SEQ CD NO.	АКР(N=79)	УКМП(N=40) 91	ПКШМ(N=30) 71	ХГК(N=36)	ДВКЛ(N=48)	ПлККГШ(N=5211)	ХКП(N=66)	ППККП(N=2011)	ГНС3(N=534)	МЕЗО(N=87)	ФХПГ(N=184)	АПрЖ(N=498)	САРК(N=263)	МК(N=473)	АКЖ(N=415)	ГГОЯ(N=156)	КЦЗ(N=513)	ТИМ(N=120)	ЭКТМ(N=546)	КСМ(N=57)	УВМ(N=80)
399							В	А		С				С	С		А				В
400		В	В		В	А				С			С	С	А				С	С	
401		В	В		В	А				С			С	С	А				С	С	
402	С	А	А	А	С	А	С	А		А	С	С	А	В	А	В	В	В	А	А	
403		С	В		В	В									В	В					
404		С	В		В	В									В	В					
405		С	В		В	В									В	В					
406		С	В	С	С	С				В					С				А	С	
407	С	А	А	С	А	В			С	С			В	В	В	А		А	В	А	
408		В	А		В	В							В	С	В	А		В	В	В	
409		В	А		В	В							С	С	В	В		В	С		
410	С	А	А	С	А	В			С	С			В	В	В	А		А	В	А	
412	С	В	А	С	В	В				А			В	В	А	А		В	С	В	
413															С						
414									А				С			С					
415	С	С	В		С	С			С				С	В	В	С		С	С	С	
416									С												
417	С	В	А	В		В				С			В	В	А	А			В	В	

### ПРИМЕР 3:

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

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению заявители провели исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8<sup>+</sup> 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 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8<sup>+</sup> Т-клетки-предшественники (Таблица 9).

#### Прайминг CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A\*02 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы информированного согласия) из Университетской клиники г. Мангейм, Германия.

МКПК и выделенные CD8<sup>+</sup> 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 (СС 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).

pMHC, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A\*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 418) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A\*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5, SEQ ID NO. 419), соответственно.

800 000 микросфер / 200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии 4 x 12,5 нг другого биотинилированного комплекса pMHC, промывали и затем добавляли 600 нг биотинилированных антител к CD28 в объеме 200 мкл. Стимуляцию проводили в 96-луночных планшетах путем совместной инкубации  $1 \times 10^6$  CD8+ Т-клеток с  $2 \times 10^5$  промытых покрытых микросфер в 200 мкл среды TCM с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3 дней при 37°C. Половина среды была затем заменена на свежую среду TCM с добавлением 80 Ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с pMHC-мультимеров использовали 8 различных молекул pMHC 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 pMHC 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 различных видов рака

Для проанализированных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса, иммуногенность *in vitro* могла быть продемонстрирована генерированием пептид-специфических Т-клеточных линий. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимеров для 2 пептидов по изобретению показаны на Фиг. 3 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 5 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 12А. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимеров для 7 пептидов по изобретению показаны на Фигурах 4 и 5 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 74 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 12Б.

#### **Таблица 9А:** Иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса *in vitro*

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

Seq ID	Последовательность	лунки
393	KYIEAIQWI	++
399	SYIDVLPEF	++
400	KYLEKYYNL	++
407	VYGIRLEHF	+++
414	MYPYIYHVL	++

#### **Таблица 12Б:** Иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса *in vitro*

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

Seq ID	Последовательность	Положительные лунки [%]
2	ALYGKLLKL	++++
7	AAAAKVPEV	+
8	KLGPFLNA	+++
9	FLGDYVENL	+
17	ILHEHHIFL	+
43	LLWAGPVTA	++++
322	ALVSGGVAQA	+
331	AIWKELISL	++
96	YYTQYSQTI	+
98	VFPRLHNVLF	+
99	QYILAVPVL	+++
102	VYPFENFEF	+++
103	NYIPVKNGKQF	+
104	SYLTWHQQI	+
105	IYNETITDLL	+
106	IYNETVRDLL	+
107	KYFPYLVVI	++
109	LFITGGQFF	++
110	SYPKIIIEF	++
111	VYVQILQKL	+
112	IYNFVESKL	+++
114	QYLDGTWSL	+++
115	RYLNKSFVL	+
119	VYRVYVTTF	+++
120	GYIEHFSW	++
122	EYQARIPEF	++
132	RYPALFPVL	+
137	EYLHNCSYF	+
139	IFGIFPNQF	++
140	RYLINSYDF	+++
142	VYVDDIYVI	++++
144	VFASLPGFLF	++
155	IYKWITDNF	++
156	YYMELTKLLL	+
157	DYIPASGFALF	+
158	IYEETRGVLKVF	+
160	RYGDGGSSF	+
161	KYPDIVQQF	+
162	KYTSYILAF	+
163	RYLTISNLQF	+
164	HYVPATKVF	+
166	FYTLPFHLI	++++

167	RYGFYYVEF	++++
168	RYLEAALRL	+++
170	QYPFHVPLL	+++
171	NYEDHFPLL	++
172	VFIFKGNEF	+
174	VYEKNGYIYF	++++
175	LYSPVPFTL	+
177	VYFKAGLDVF	+
179	TYIPVGLGRLL	+++
180	KYLQVVGMF	+
181	VYPPYLNLY	++++
182	AYAQLGYLLF	+++
186	VFTTSSNIF	+
190	LYSELTETL	++++
277	FYTFPFQQL	+++
344	EYNSDLHQF	+
345	EYNSDLHQFF	++
349	QYSIISNVF	++
350	KYGNFIDKL	+++
351	IFHEVPLKF	++
353	TYGKIDLGF	+
354	VYNEQIRDLL	+
356	NYMPGQLTI	+
358	YYSEVPVKL	++++
359	NYGVLHVTF	+
360	VFSPDGHLF	++
363	SYAELGTTI	+
365	VFIDHPVHL	+
366	QYLELAHSL	++
367	LYQDHMQYI	++
371	AYSHLRYVF	++
380	VYTGIDHHW	+

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 часа при 37°C в 2% БСА, содержащем блокирующий буфер. 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 авидность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

Таблица 13: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A\*02 распределено по выходу пептидного обмена: <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 % = +++; >= 75 % = ++++

Seq ID	Последовательность	Пептидный обмен
1	PLWGKVFYL	++
2	ALYGKLLKL	+++
3	TLLGKQVTL	+++
4	ELAEIVFKV	+++
5	SLFGQEVYC	+++
6	FLDPAQRDL	+++
7	AAAAKVPEV	+++
8	KLGPFLNA	+++
9	FLGDYVENL	++
10	KTLDFNII	++
11	GVLKVFLENV	++
12	GLIYEETRGV	++
13	VLRDNIQGI	+++
14	LLDHLSFINKI	++
16	HLYNNEEQV	++
17	ILHEHHIFL	+++
18	YVLNEEDLQKV	+++
19	TLLPTVTL	+++
20	ALDGHLYAI	+++
21	SLYHRVLLY	++++
22	MLSDLTLQL	++++
23	AQTVVVIKA	+
24	FLWNGEDSAL	+++
25	IQADDFRTL	++
26	KVDGVVIQL	+++
27	KVFGDLQV	+++
28	TLYSMDLMKV	+++
29	TLCNKTFATA	+++
31	ALSDETKNNWEV	++++
32	ILADEAFFSV	+++
33	LLLPLPPLSPSLG	+++
35	YVLPKLYVKL	++
36	KLYGIEIEV	++++
37	ALINDILGELVKL	+++
38	KMQEDLVTL	+++
39	ALMAVVSGL	+++
40	SLLALPQDLQA	+++
41	FVLPLVVTL	+++
42	VLSPFILTL	+++
43	LLWAGPVTA	+++
44	GLLWQIIKV	++
45	VLGPTPELV	+++

46	SLAKHGIVAL	+++
47	GLYQAQVNL	+++
48	TLDHKPVTV	++
49	LLDESKLTL	+++
50	EYALLYHTL	++
51	LLLDGDFTL	+++
52	ELLSSIFFL	+++
53	SLLSHVIVA	+++
54	FINPKGNWLL	+++
55	IASAIVNEL	++
56	KILDLTRVL	++
57	VLISSTVRL	++
58	ALDDSLTSL	++
59	ALTKILAEI	+++
60	FLIDTSASM	++
61	HLPDFVKQL	++
62	SLFNQEVQI	+++
63	TLSSERDFAL	+
64	GLSSSSYEL	++
65	KLDGICWQV	+++
66	FITDFYTTV	+++
67	GVIETVTSL	++
69	GIYDGILHSI	+++
70	GLFSQHFNL	+++
71	GLITVDIAL	+++
72	GMIGFQVLL	+++
74	ILDETLENV	++
75	ILDNVKNLL	+++
76	ILLDESNFNHFL	+++
77	IVLSTIASV	+++
78	LLWGHPRVA	+++
79	SLVPLQILL	++++
80	TLDEYLTYL	+++
81	VFLGKLLV	++
82	VLLRVLIL	++
83	ELLEYPQL	+++
84	FLEEEITRV	+++
85	STLDGSLHAV	+++
87	YLTEVFLHVV	+++
88	ILLNTEDLASL	+++
89	YLVAHNLLL	+++
90	GAVAEVLSSI	+
91	SSLEPQIQPV	+

92	LLRGPPVARA	++
93	SLLTQIFL	+++
321	SLWFKPEEL	+++
322	ALVSGGVAQA	+++
323	ILSVVNSQL	+++
324	AIFDFCPSV	++++
325	RLLPKVQEV	++
326	SLLPLVWKI	+++
327	SIGDIFLKY	+++
328	SVDSAPAAV	++
329	FAWEPSFRDQV	++
330	FLWPKEVEL	+++
331	AIWKELISL	+++
333	GTFLEGVAK	+++
334	GRADALRVL	+++
335	VLLAAGPSAA	++
336	GLMDGSPHFL	++
337	KVLGKIEKV	+++
338	LLYDGKLSSA	++
339	VLGPGPPPL	++
340	SVAKTILKR	++

Таблица 14: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A\*24 распределено по выходу пептидного обмена: <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 % = +++; >= 75 % = ++++

Seq ID	Последовательность	Пептидный обмен
96	YYTQYSQTI	++++
97	TYTFLKETF	++++
98	VFPRLHNVLF	+++
99	QYILAVPVL	++++
100	VYIESRIGTSTSF	+++
102	VYPFENFEF	+++
103	NYIPVKNGKQF	+++
104	SYLTWHQQI	++++
105	IYNETITDLL	+++
106	IYNETVRDLL	+++
107	KYFPYLVVI	+++
108	PYLVVIHTL	+++
109	LFITGGQFF	++++
110	SYPKIIIEF	+++
111	VYVQILQKL	+++
112	IYNFVESKL	+++
113	IYSFHTLSF	+++
114	QYLDGTWSL	++++
115	RYLNKSFVL	+++
116	AYVIAVHLF	++++
117	IYLSDLTYI	+++
118	KYLNSVQYI	+++
119	VYRVYVTTF	+++
120	GYIEHFSLW	++++
121	RYGLPAAWSTF	+++
122	EYQARIPEF	+++
123	VYTPVLEHL	++
124	TYKDYVDLF	+
125	VFSRDFGLLVF	+++
127	QYFTGNPLF	+++
128	VYPFDWQYI	++++
129	KYIDYLMTW	++++
131	EYLDRIGQLFF	+++
132	RYPALFPVL	++++
133	KYLEDMKTYF	+++
134	AYIPTPIYF	+++
135	VYEAMVPLF	++++
136	IYPEWPVVF	+++
137	EYLHNCSYF	++++
138	VYNAVSTSF	++
139	IFGIFPNQF	+++
140	RYLINSYDF	++++

141	SYNGHLTIWF	+++
142	VYVDDIYVI	+++
143	KYIFQLNEI	+++
144	VFASLPGFLF	++++
145	VYALKVRTI	+++
146	NYYERIHAI	+++
147	LYLAFPLAF	+++
148	SYGTVSQIF	++++
149	SYGTVSQI	++++
152	KFFDDLGDLELF	++
153	VYVDFGGKSMITF	++++
154	VYGVPTPHF	++++
155	IYKWITDNF	++++
156	YMEITKLLL	++++
157	DYIPASGFALF	+++
158	IYEETRGVLKVF	+++
159	IYEETRGVL	+++
160	RYGDGSSSF	+++
161	KYPDIVQQF	+++
162	KYTSYILAF	++
163	RYLTISNLQF	++++
164	HYVPATKVF	+++
165	EYFTPLLSGQF	+++
166	FYTLPFHLI	++++
167	RYGFYYVEF	+++
168	RYLEAALRL	+++
169	NYITGKGDVF	+++
170	QYPFHVPLL	++++
171	NYEDHFPLL	+++
172	VFIFKGNEF	++++
173	QYLEKYYNL	++++
174	VYEKNGYIYF	+++
175	LYSPVPFTL	+++
176	FYINGQYQF	+++
177	VYFKAGLDVF	+++
178	NYSSAVQKF	+++
179	TYIPVGLGRLL	+++
180	KYLQVVGMF	+++
181	VYPPYLNLY	+++
182	AYAQLGYLLF	++++
183	PYLQDVPRI	+++
184	IYSVGAFENF	++++
185	QYLVHVNDL	++++

186	VFTTSSNIF	++++
187	AYAANVHYL	++++
188	GYKTFFNEF	+++
190	LYSELTETL	+++
191	TYPDGTYTGRIF	+++
192	RYSTFSEIF	+++
193	LYLENNAQTQF	+++
194	VYQSLSNSL	+++
195	AYIKGGWIL	+++
196	GYIRGSWQF	++++
197	IFTDIFHYL	++++
198	DYVGFTLKI	++
199	SYLNHLNNL	+++
200	VFIHHLPOF	+++
201	GYNPNRVFF	+++
202	RYVEGIVSL	+++
204	EYLSTCSKL	+++
205	VYPVVLNQI	+++
206	NYLDVATFL	++++
207	LYSDAFKFIVF	+++
208	TYLEKIDGF	++++
209	AFIETPIPLF	++++
210	IYAGVGEFSF	++++
211	VFKSEGAYF	++++
212	SYAPPSDLF	++
213	SYAPPSDLFL	++
214	KYLMELTLI	+++
215	SYVASFFLL	++
216	FYVNVKEQF	+++
217	IYISNSIYF	++++
218	LYSELNKWSF	+++
219	SYLKAVFNL	+++
220	SYSEIKDFL	++++
221	KYIGNLDLL	++++
223	TFITQSPLL	++++
224	PYFFANQEF	+++
225	TYTNTLERL	+++
226	MYLKLVLQF	++
227	IYRFITERF	+++
228	IYQYVADNF	+++
229	IYQFVADSF	+++
230	TYGMVMVTF	+++
231	AFADSVVKF	++++

232	YYLSDSPLL	+++
233	QYLTAALHNL	+++
234	SYLPAIWLL	+++
235	VYKDSIYYI	+++
236	VYLPKIPSW	+++
237	KYVGQLAVL	+++
239	VYAIFRILL	+++
240	YYFFVQEKI	+++
241	SYVKVLHHL	+++
242	VYGEPRELL	+++
243	SYLELANTL	+++
244	VHFEDTGKTLF	+++
245	LYPQLFVVL	+++
246	KYLSVQLTL	++
247	SFTKTSPNF	+++
248	AFPTFSVQL	++++
249	RYHPTTCTI	++++
250	KYPDIASPTF	++
251	VYTKALSSL	+++
252	AFGQETNVPLNNF	++++
253	IYGFFNENF	+++
254	KYLESSATF	+++
255	VYQKILKF	+++
256	VFGKSAYLF	+++
257	IFIDNSTQPLHF	+++
258	AYAQLGYLL	+++
259	YFIKSPPSQLF	++
260	VYMNVMTRL	++++
261	GYIKLINFI	++++
262	VYSSQFETI	++++
263	RYILENHDF	+++
264	LYTETRLQF	++++
265	SYLNEAFSF	++++
266	KYTDWTEFL	+++
267	SFLNIEKTEILF	++
268	IFITKALQI	++
269	QYPYLQAFF	+++
270	YYSQESKVLYL	+++
271	RFLMKSYSF	++++
272	RYVFPLPYL	++++
273	IYGEKLQFIF	+++
274	KQLDIANYELF	++++
275	KYGTLDVTF	++++

276	QYLDVLHAL	++++
277	FYTFPFQQL	+++
279	VWLPASVLF	+++
280	TYNPNLQDKL	++++
281	NYSPGLVSLIL	+++
282	NYLVDPVTI	+++
283	EYQEIFQQL	+++
284	DYLKDPVTI	+++
285	VYVGDALLHAI	+++
286	SYGTILSHI	++++
287	IYNPNLLTASKF	+++
288	VYPDTVALTF	++
289	FFHEGQYVF	++++
290	KYGDFKLLEF	++++
291	YYLGSGRETF	+++
292	FYPQIINTF	++++
293	VYPHFSTTNLI	++++
294	RFPVQGTVTF	+++
295	SYLVIHERI	+++
296	SYQVIFQHF	++++
297	TYIDTRTVF	++++
298	AYKSEVVYF	++++
299	KYQYVLNEF	+++
300	TYPSQLPSL	+++
301	KFDDVTMLF	++++
302	LYLPVHYGF	+++
303	LYSVIKEDF	+++
304	EYNEVANLF	+++
305	NYENKQYLF	++++
306	VYPAEQPQI	+++
307	GYAFTLPLF	+++
308	TFDGHGVFF	+++
309	KYYRQTLLF	++
310	IYAPTLLVF	+++
311	EYLQNLNHI	++++
312	SYTSVLSRL	+++
313	KYTHFIQSF	++++
314	RYFKGDYSI	+++
315	FYIPHVPVSF	+++
316	VYFEGSDFKF	+++
317	VFDTSIAQLF	+++
318	TYSNSAFQYF	+++
319	KYSDVKNLI	++++

341	SYLTQHORI	+++
342	NYAFLHRTL	+++
343	NYLGGTSTI	+++
344	EYNSDLHQF	+++
345	EYNSDLHQFF	+++
347	VYAEVNSL	+++
348	IYLEHTESI	+++
349	QYSIISNVF	+++
350	KYGNFIDKL	+++
351	IFHEVPLKF	+++
352	QYGGDLTNTF	+++
353	TYGKIDLGF	+++
354	VYNEQIRDLL	+++
355	IYVTGGHLF	+++
356	NYMPGQLTI	++++
357	QFITSTNTF	++++
358	YYSEVPVKL	+++
359	NYGVLHVTF	++++
360	VFSPDGHLF	+++
361	TYADIGGLDNQI	+++
362	VYNYAEQTL	++
363	SYAELGTTI	++
364	KYLNENQLSQL	+++
365	VFIDHPVHL	++++
366	QYLELAHSL	+++
367	LYQDHMQYI	++
368	KYQNVKHNL	+++
369	VYTHEVVTL	+++
370	RFIGIPNQF	+++
371	AYSHLRYVF	++
372	VYVIEPHSMEF	+++
373	GYISNGELF	+++
374	VFLPRVTEL	++
375	KYTDYILKI	+++
376	VYTPVASRQSL	+++
377	QYTPHSHQF	+++
378	VYIAELEKI	+++
379	VFIAQGYTL	++++
380	VYTGIDHHW	++++
381	KYPASSSVF	+++
382	AYLPPLQQVF	+++
383	RYKPGEPITF	+++
384	RYFDVGLHNF	+++

385	QYIEELQKF	+++
386	TFSDVEAHF	+++
387	KYTEKLEEI	+++
388	IYGEKTYAF	+++

ПРИМЕР 6:

Абсолютное количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентуемых на поверхности клетки

Получение связывающих компонентов, таких как антитела и/или ТКР, является лабораторным процессом, который может проводиться лишь для ряда выбранных мишеней. В случае опухолеассоциированных и -специфических пептидов, критерии отбора включали, но не были ограничены, исключительностью презентации и плотностью пептида, презентуемого на поверхности клеток. В дополнение к выделению и относительному количественному определению пептидов, описанных в Примере 1, заявители анализировали абсолютное число копий пептида на клетку согласно описанию. Количественное определение копий TUMAP на клетку в образцах солидных опухолей требует абсолютного количественного определения выделенного пептида TUMAP, эффективности выделения TUMAP и числа клеток проанализированного образца ткани.

Количественное определение пептида с помощью наноЖХ-МС/МС

Для точного количественного определения пептидов методом масс-спектрометрии проводили построение калибровочной кривой для каждого пептида при использовании метода внутреннего стандарта. Внутренний стандарт является вариантом каждого пептида с двойными изотопными метками, т. е. во время синтеза TUMAP были введены две аминокислоты с изотопными метками. От опухолеассоциированного пептида он отличается лишь по своей массе, но не имеет различий по другим физико-химическим свойствам (Anderson et al., 2012). Внутренний стандарт добавляли в известном количестве в каждый МС-образец, и все МС-сигналы были нормализованы относительно МС-сигнала внутреннего стандарта, чтобы сгладить потенциальные технические вариации МС-экспериментов.

Калибровочные кривые были построены по меньшей мере в трех разных матрицах, т. е. элюатах пептида HLA из природных образцов, подобных обычным образцам для МС, и каждый препарат прошел два цикла измерений на МС. В целях оценки проводили

нормализацию МС-сигналов относительно сигнала внутреннего стандарта и расчет калибровочной кривой методом логистической регрессии.

Для количественного определения опухолеассоциированных пептидов из образцов тканей в соответствующие образцы также добавляли известное количество внутреннего стандарта; проводили нормализацию МС-сигналов относительно внутреннего стандарта и проводили количественное определение с помощью калибровочной кривой пептида.

#### Эффективность выделения комплексов пептид/МНС

Как в случае любого процесса очистки белков, выделение белков из образцов ткани связано с определенными потерями исследуемого белка. Для определения эффективности выделения пептида TUMAP для всех пептидов TUMAP, выбранных для абсолютного количественного определения, были получены комплексы пептид-МНС. Чтобы отличить комплексы пептид-МНС со стандартными добавками от комплексов с природным пептидом, использовали версии пептидов TUMAP с одной изотопной меткой, т. е. во время синтеза TUMAP вводили одну аминокислоту с изотопной меткой. Данные комплексы добавляли в качестве стандартной добавки в свежеприготовленные лизаты тканей, т. е. в самый ранний возможный момент процесса выделения пептида TUMAP, а затем проводили улавливание, как природных комплексов пептид-МНС в процессе последующей аффинной очистки. Таким образом, измерение степени извлечения однократно меченых пептидов TUMAP позволяет сделать заключения относительно эффективности выделения отдельных природных пептидов TUMAP.

Эффективность выделения анализировали на небольшом числе образцов, и она была сопоставимой среди этих образцов тканей. Напротив, эффективность выделения отдельных пептидов различна. Поэтому можно предположить, что эффективность выделения, хотя она определялась только для ограниченного числа образцов тканей, может быть экстраполирована на любой другой препарат ткани. Тем не менее, необходимо проанализировать каждый пептид TUMAP в отдельности, поскольку эффективность выделения не может быть экстраполирована с одного пептида на другие.

#### Определение числа клеток в твердой замороженной ткани

В целях определения числа клеток образцов тканей, подлежащих абсолютному количественному определению пептида, авторы изобретения применяли анализ содержания ДНК. Этот метод применим к широкому диапазону образцов различного происхождения

и, что наиболее важно, к замороженным образцам (Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Во время выполнения протокола выделения образец ткани обрабатывают до получения гомогенного лизата, из которого берут небольшую аликвоту лизата. Аликвоту делят на три части, из которых выделяют ДНК (набор QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Хильден, Германия). Общее содержание ДНК из каждой процедуры выделения ДНК подвергается количественному определению с помощью количественного анализа ДНК на основе флуоресценции (набор для количественного анализа Qubit dsDNA HS, Life Technologies, Дармштадт, Германия) по меньшей мере на двух повторных циклах.

В целях расчета числа клеток по аликвотам отдельных здоровых клеток крови строят стандартную кривую для ДНК с диапазоном заданных количеств клеток. Стандартная кривая используется для расчета общего содержания клеток из общего содержания ДНК для каждой процедуры выделения ДНК. Среднее общее число клеток образца ткани, используемого для выделения пептида, экстраполируют с учетом известного объема аликвот лизата и общего объема лизата.

#### Число копий пептида на одну клетку

С помощью данных перечисленных ранее экспериментов авторы изобретения рассчитали число копий пептидов TUMAP на клетку, разделив общее количество пептида на общее число клеток в образце, а затем поделив на эффективность выделения. Число копий клеток для выбранных пептидов показано в Таблице 15.

Таблица 15: Абсолютное число копий. В таблице указаны результаты абсолютного количественного определения пептидов в опухолевых образцах. Медианное число копий на клетку указано для каждого пептида: <100 = +; >=100 = ++; >=1,000 +++; >=10,000 = ++++. Указано число образцов, для которых имеются поддающиеся оценке, высококачественные данные МС.

SEQ ID No.	Код пептида	Число копий на клетку (медиана)	Количество образцов
70	DNMT3B-001	++	16
323	KIAA0226L-002	++	19
325	ZNF-003	++	14

Список цитируемой литературы

- Aalto, Y. et al., *Leukemia* **15** (2001): 1721-1728
- Abaan, O. D. et al., *Cancer Res* **73** (2013): 4372-4382
- Accardi, L. et al., *Int.J Cancer* **134** (2014): 2742-2747
- Adams, D. J. et al., *Mol.Cell Biol* **25** (2005): 779-788
- Agha-Hosseini, F. et al., *Med.J Islam Repub.Iran* **29** (2015): 218
- Agostini, M. et al., *Oncotarget*. **6** (2015): 32561-32574
- Akiyama, Y. et al., *Oncol.Rep.* **31** (2014): 1683-1690
- Al-haidari, A. A. et al., *Int.J Colorectal Dis.* **28** (2013): 1479-1487
- Alcoser, S. Y. et al., *BMC.Biotechnol.* **11** (2011): 124
- Allison, J. P. et al., *Science* **270** (1995): 932-933
- Alonso, C. N. et al., *Leuk.Res.* **36** (2012): 704-708
- Amaro, A. et al., *Cancer Metastasis Rev* **33** (2014): 657-671
- American Cancer Society, (2015), [www.cancer.org](http://www.cancer.org)
- Ammirante, M. et al., *Nature* **464** (2010): 302-305
- Ampie, L. et al., *Front Oncol.* **5** (2015): 12
- An, C. H. et al., *Hum.Pathol.* **43** (2012): 40-47
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012): 891-902
- Anderson, N. L. et al., *J Proteome.Res* **11** (2012): 1868-1878
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006): 1805-1814
- Arai, E. et al., *Int.J Cancer* **137** (2015): 2589-2606
- Armitage, J. O., *Blood* **110** (2007): 29-36
- Armstrong, C. M. et al., *Am.J Clin Exp.Urol.* **3** (2015): 64-76
- Asahara, S. et al., *J Transl.Med.* **11** (2013): 291
- Atcheson, E. et al., *Biosci.Rep.* **31** (2011): 371-379
- Avigan, D. et al., *Clin Cancer Res.* **10** (2004): 4699-4708
- Azevedo, R. et al., *J Control Release* **214** (2015): 40-61
- Baek, J. M. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **461** (2015): 334-341

- Baker, M. et al., PLoS.One. **8** (2013): e62516
- Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274
- Bankovic, J. et al., Lung Cancer **67** (2010): 151-159
- Barlin, J. N. et al., Neoplasia. **17** (2015): 183-189
- Batliner, J. et al., Mol.Immunol. **48** (2011): 714-719
- Battistella, M. et al., J Cutan.Pathol. **41** (2014): 427-436
- Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282
- Becker, M. A. et al., Mol.Cancer Ther. **14** (2015): 973-981
- Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109
- Benada, J. et al., Biomolecules. **5** (2015): 1912-1937
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300
- Bentz, S. et al., Digestion **88** (2013): 182-192
- Berard, A. R. et al., Proteomics. **15** (2015): 2113-2135
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)
- Berndt, S. I. et al., Nat Commun. **6** (2015): 6889
- Bie, L. et al., PLoS.One. **6** (2011): e25631
- Bill, K. L. et al., Lab Invest (2015)
- Binsky-Ehrenreich, I. et al., Oncogene **33** (2014): 1006-1016
- Black, J. D. et al., Toxins.(Basel) **7** (2015): 1116-1125
- Bo, H. et al., BMC.Cancer **13** (2013): 496
- Bockelman, C. et al., Cancer Biol Ther. **13** (2012): 289-295
- Boeva, V. et al., PLoS.One. **8** (2013): e72182
- Bogdanov, K. V. et al., Tsitologiiia **50** (2008): 590-596
- Bogni, A. et al., Leukemia **20** (2006): 239-246
- Boldt, H. B. et al., Endocrinology **152** (2011): 1470-1478
- Bormann, F. et al., Mol.Genet.Genomics **286** (2011): 279-291

- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* **132** (2013): 1133-1145
- Brenner, S. et al., *Cancer Lett.* **356** (2015): 517-524
- Bridgewater, J. et al., *J Hepatol.* **60** (2014): 1268-1289
- Brocker, E. B. et al., *Int.J Cancer* **41** (1988): 562-567
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Bryant, N. L. et al., *J Neurooncol.* **101** (2011): 179-188
- Burgess, A. W. et al., *Exp.Cell Res* **317** (2011): 2748-2758
- Butler, J. E. et al., *J Immunol.* **182** (2009): 6600-6609
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **9** (2003): 5902-5908
- Byrd, J. C. et al., *N.Engl.J Med.* **369** (2013): 32-42
- Byrns, M. C. et al., *J Steroid Biochem.Mol.Biol* **125** (2011): 95-104
- Cai, C. J. et al., *Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* **41** (2010): 941-945
- Camoses, M. J. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e49819
- Cao, S. et al., *J Virol.* **89** (2015): 713-729
- Cao, W. et al., *J Biol Chem* **282** (2007): 18922-18928
- Carballido, E. et al., *Cancer Control* **19** (2012): 54-67
- Carbonnelle-Puscian, A. et al., *Leukemia* **23** (2009): 952-960
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Carlsten, M. et al., *Cancer Res* **67** (2007): 1317-1325
- Carr, J. C. et al., *Surgery* **152** (2012): 998-1007
- Carr, J. C. et al., *Ann.Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013): S739-S746
- Cassoni, P. et al., *J Neuroendocrinol.* **16** (2004): 362-364
- Catellani, S. et al., *Blood* **109** (2007): 2078-2085
- Cavard, C. et al., *J Pathol.* **218** (2009): 201-209

- Chae, Y. K. et al., *Oncotarget*. **6** (2015): 37117-37134
- Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **59** (2007): 561-574
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- Chapiro, J. et al., *Radiol.Med.* **119** (2014): 476-482
- Che, J. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015): 6559-6568
- Chen, H. S. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* **11** (2003): 145-148
- Chen, H. W. et al., *Mol.Carcinog* **52** (2013): 647-659
- Chen, J. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **75** (2015): 1217-1227
- Chen, R. S. et al., *Oncogene* **28** (2009): 599-609
- Chen, W. L. et al., *BMC.Cancer* **12** (2012): 273
- Chen, Y. et al., *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **306** (2014): L797-L807
- Cheong, S. C. et al., *Oral Oncol* **45** (2009): 712-719
- Chinwalla, V. et al., *Oncogene* **22** (2003): 1400-1410
- Chisholm, K. M. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e30748
- Choi, H. H. et al., *Oncotarget.* **6** (2015a): 19721-19734
- Choi, H. H. et al., *Oncotarget.* **6** (2015b): 11779-11793
- Chudnovsky, Y. et al., *Cell Rep.* **6** (2014): 313-324
- Cicek, M. et al., *PLoS.One.* **6** (2011): e17522
- Cipriano, R. et al., *Oncotarget.* **4** (2013): 729-738
- Cipriano, R. et al., *Mol.Cancer Res* **12** (2014): 1156-1165
- 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
- Cohen, Y. et al., *Hematology.* **19** (2014): 286-292
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- Colombetti, S. et al., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738
- Coosemans, A. et al., *Anticancer Res* **33** (2013): 5495-5500
- Cotterchio, M. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0125273

- Counter, C. M. et al., *Blood* **85** (1995): 2315-2320
- Courtial, N. et al., *FASEB J* **26** (2012): 523-532
- Crawford, H. C. et al., *Curr.Pharm.Des* **15** (2009): 2288-2299
- Cribier, B. et al., *Br.J Dermatol.* **144** (2001): 977-982
- Cui, D. et al., *Oncogene* **33** (2014): 2225-2235
- Dahlman, K. B. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e34414
- Dai, X. et al., *J Virol.* **88** (2014): 12694-12702
- de Kruijf, E. M. et al., *BMC.Cancer* **12** (2012): 24
- De, S. et al., *Cancer Res* **69** (2009): 8035-8042
- Dedes, K. J. et al., *Sci.Transl.Med.* **2** (2010): 53ra75
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003): 2197-2207
- Dhanoa, B. S. et al., *Hum.Genomics* **7** (2013): 13
- Ding, M. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 7686-7700
- Donnard, E. et al., *Oncotarget.* **5** (2014): 9199-9213
- Drayton, R. M. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 1990-2000
- Drutskaya, M. S. et al., *IUBMB.Life* **62** (2010): 283-289
- Du, C. et al., *Gastric.Cancer* **18** (2015): 516-525
- Du, H. et al., *Protein Pept.Lett.* **16** (2009): 486-489
- Duffy, M. J. et al., *Clin Cancer Res* **15** (2009): 1140-1144
- Dufour, C. et al., *Cancer* **118** (2012): 3812-3821
- Economopoulou, P. et al., *Ann.Transl.Med.* **4** (2016): 173
- Ehlken, H. et al., *Int.J Cancer* **108** (2004): 307-313
- Eichhorst, B. F. et al., *Blood* **107** (2006): 885-891
- Eijssink, J. J. et al., *Int.J Cancer* **130** (2012): 1861-1869
- Eisele, G. et al., *Brain* **129** (2006): 2416-2425
- Elbelt, U. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* **100** (2015): E119-E128
- Elsnerova, K. et al., *Oncol Rep.* (2016)

- Emens, L. A., *Expert.Rev.Anticancer Ther.* **12** (2012): 1597-1611
- Engelmann, J. C. et al., *PLoS.Comput.Biol* **11** (2015): e1004293
- Enguita-German, M. et al., *World J Hepatol.* **6** (2014): 716-737
- Er, T. K. et al., *J Mol.Med.(Berl)* (2016)
- Eruslanov, E. et al., *Clin.Cancer Res.* **19** (2013): 1670-1680
- Espiard, S. et al., *Endocrinol.Metab Clin North Am.* **44** (2015): 311-334
- Estey, E. H., *Am.J Hematol.* **89** (2014): 1063-1081
- Etcheverry, A. et al., *BMC.Genomics* **11** (2010): 701
- Faget, J. et al., *Oncoimmunology* **2** (2013): e23185
- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Fang, M. et al., *Mol.Cell Biol* **33** (2013): 2635-2647
- Fang, Y. et al., *Tumour.Biol* **33** (2012): 2299-2306
- Farrell, A. S. et al., *Mol.Cancer Res* **12** (2014): 924-939
- Ferlay et al., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>*
- Fernandez-Calotti, P. X. et al., *Haematologica* **97** (2012): 943-951
- Fevre-Montange, M. et al., *J Neuropathol.Exp.Neurol.* **65** (2006): 675-684
- Finocchiaro, G. et al., *Ann.Transl.Med.* **3** (2015): 83
- Fiorito, V. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1839** (2014): 259-264
- Fokas, E. et al., *Cell Death.Dis.* **3** (2012): e441
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- Ford-Hutchinson, A. W., *Eicosanoids* **4** (1991): 65-74
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* **31** (2009): 819-823
- Fremont, S. et al., *EMBO Rep.* **14** (2013): 364-372
- Fritz, P. et al., *Pathol.Res Pract.* **208** (2012): 203-209
- Fuge, O. et al., *Res Rep.Urol.* **7** (2015): 65-79
- Fujita, H. et al., *J Histochem.Cytochem.* **63** (2015): 217-227
- Fukuyama, R. et al., *Oncogene* **27** (2008): 6044-6055

- Furman, R. R. et al., *N.Engl.J Med.* **370** (2014): 997-1007
- Furukawa, T. et al., *Sci.Rep.* **1** (2011): 161
- Gabrielson, M. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **469** (2016): 1090-1096
- Gabrielson, M. et al., *Oncol Rep.* **29** (2013): 1268-1274
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
- Galazis, N. et al., *Gynecol.Endocrinol.* **29** (2013): 638-644
- Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013): S636-S643
- Gao, M. et al., *Diagn.Pathol.* **8** (2013): 205
- Garbe, C. et al., *J Invest Dermatol.* **100** (1993): 239S-244S
- Garcia-Irigoyen, O. et al., *Hepatology* **62** (2015): 166-178
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
- Gazy, I. et al., *Mutat.Res Rev Mutat.Res* **763** (2015): 267-279
- Gelsi-Boyer, V. et al., *Mol.Cancer Res* **3** (2005): 655-667
- Ghosh, A. et al., *Int.J Biol Sci.* **12** (2016): 30-41
- Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* **24** (2010): 798-805
- Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 95-103
- 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
- Goede, V. et al., *N.Engl.J Med.* **370** (2014): 1101-1110
- Gonda, T. J. et al., *Expert.Opin.Biol Ther.* **8** (2008): 713-717
- Goni, M. H. et al., *Anticancer Res* **13** (1993): 1155-1160
- Granziero, L. et al., *Blood* **97** (2001): 2777-2783
- Green, J. et al., *Cochrane.Database.Syst.Rev* (2005): CD002225
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Grimm, M. et al., *J Transl.Med.* **12** (2014): 208
- Grinberg-Rashi, H. et al., *Clin Cancer Res* **15** (2009): 1755-1761
- Grivas, P. D. et al., *Semin.Cancer Biol* **35** (2015): 125-132

- Gruel, N. et al., *Breast Cancer Res* **16** (2014): R46
- Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008): 606-609
- Guo, P. et al., *Onco.Targets.Ther.* **8** (2015a): 73-79
- Guo, T. et al., *Int.J Cancer* (2016)
- Guo, Z. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015b): 3583-3589
- Guo, Z. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015c): 4777-4783
- Guyonnet, Duperat, V et al., *Biochem.J* **305 ( Pt 1)** (1995): 211-219
- Hallek, Michael et al., *ASH Annual Meeting Abstracts* **112** (2008): 325
- Halon, A. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **287** (2013): 563-570
- Handkiewicz-Junak, D. et al., *Eur.J Nucl.Med.Mol.Imaging* (2016)
- Hapgood, G. et al., *Blood* **126** (2015): 17-25
- Harig, S. et al., *Blood* **98** (2001): 2999-3005
- Hayette, S. et al., *Oncogene* **19** (2000): 4446-4450
- He, H. et al., *Diagn.Mol.Pathol.* **21** (2012): 143-149
- He, M. et al., *J Dig.Dis.* **12** (2011): 393-400
- Heerma van Voss, M. R. et al., *Histopathology* **65** (2014): 814-827
- Heishima, K. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0137361
- Hill, S. J. et al., *Genes Dev.* **28** (2014): 1957-1975
- Hinrichs, C. S. et al., *Nat.Biotechnol.* **31** (2013): 999-1008
- Hirahata, M. et al., *Cancer Med.* (2016)
- Hirano, Y. et al., *Genes Cells* **11** (2006): 1295-1304
- Hlavac, V. et al., *Medicine (Baltimore)* **93** (2014): e255
- Holla, S. et al., *Mol.Cancer* **13** (2014): 210
- Holtl, L. et al., *Clin.Cancer Res.* **8** (2002): 3369-3376
- Hong, L. et al., *Hum.Pathol.* **45** (2014): 2423-2429
- Honore, B. et al., *Exp.Cell Res* **294** (2004): 199-209
- Horig, H. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **49** (2000): 504-514
- Hu, X. T. et al., *Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.* **30** (2008): 515-518

- Hu, X. T. et al., *Oncol Rep.* **22** (2009): 1247-1252
- Huang, P. Y. et al., *Leuk.Lymphoma* **55** (2014): 2085-2092
- Huang, Y. et al., *Clin Epigenetics.* **8** (2016): 9
- Huang, Y. et al., *PLoS.One.* **8** (2013a): e82519
- Huang, Y. et al., *Cell Biosci.* **3** (2013b): 16
- Huang, Y. X. et al., *Nan.Fang Yi.Ke.Da.Xue.Xue.Bao.* **29** (2009): 1329-1332
- Hubertus, J. et al., *Oncol Rep.* **25** (2011): 817-823
- Huisman, C. et al., *Mol. Ther.* (2015)
- Huisman, C. et al., *Mol.Oncol* **7** (2013): 669-679
- Hung, C. F. et al., *Immunol.Rev* **222** (2008): 43-69
- Hus, I. et al., *Oncol Rep.* **20** (2008): 443-451
- Hussein, S. et al., *Sci.Rep.* **5** (2015): 15752
- Huu, N. T. et al., *FEBS J* **282** (2015): 4727-4746
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Ihn, H. J. et al., *Exp.Biol Med.(Maywood.)* **240** (2015): 1690-1697
- Ilm, K. et al., *Mol.Cancer* **14** (2015): 38
- Imai, K. et al., *Br.J Cancer* **104** (2011): 300-307
- Inoue, K. et al., *Subcell.Biochem.* **85** (2014): 17-40
- Ishida, T. et al., *Leukemia* **20** (2006): 2162-2168
- Ishizone, S. et al., *Cancer Sci.* **97** (2006): 119-126
- Iunusova, N. V. et al., *Izv.Akad.Nauk Ser.Biol* (2014): 448-455
- Iunusova, N. V. et al., *Izv.Akad.Nauk Ser.Biol* (2013): 284-291
- Iwakawa, R. et al., *Carcinogenesis* **36** (2015): 616-621
- Jager, D. et al., *Cancer Res* **60** (2000): 3584-3591
- Jaiswal, A. S. et al., *Bioorg.Med.Chem Lett.* **24** (2014): 4850-4853
- Januchowski, R. et al., *Biomed.Pharmacother.* **67** (2013): 240-245
- Januchowski, R. et al., *Biomed.Pharmacother.* **68** (2014): 447-453
- Jelinek, J. et al., *PLoS.One.* **6** (2011): e22110

- Jenne, D. E. et al., *Am.J Hum.Genet.* **69** (2001): 516-527
- Jiang, H. et al., *Int.J Mol.Med.* **35** (2015a): 1374-1380
- Jiang, H. et al., *Exp.Ther.Med.* **8** (2014a): 769-774
- Jiang, H. N. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e67637
- Jiang, L. et al., *Cell Cycle* **14** (2015b): 2881-2885
- Jiang, L. et al., *Oncotarget.* **5** (2014b): 7663-7676
- Jiang, Y. et al., *Mol.Cell* **53** (2014c): 75-87
- Jiao, X. L. et al., *Eur.Rev Med.Pharmacol.Sci.* **18** (2014): 509-515
- Johnson, M. A. et al., *Growth Horm.IGF.Res* **24** (2014): 164-173
- Jones, R. T. et al., *Urol.Clin North Am.* **43** (2016): 77-86
- Ju, W. et al., *Oncol.Res.* **18** (2009): 47-56
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
- Junttila, M. R. et al., *Cell Cycle* **7** (2008): 592-596
- Kachakova, D. et al., *J BUON.* **18** (2013): 660-668
- Kadeh, H. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **16** (2015): 6609-6613
- Kalikin, L. M. et al., *Genomics* **57** (1999): 36-42
- Kalos, M. et al., *Sci.Transl.Med.* **3** (2011): 95ra73
- Kang, Y. K. et al., *Cancer Res* **68** (2008): 7887-7896
- Kanthan, R. et al., *J Oncol* **2015** (2015): 967472
- Kanzaki, H. et al., *Oncol Rep.* **18** (2007): 1171-1175
- Kanzaki, H. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* **134** (2008): 211-217
- Kanzawa, M. et al., *Pathobiology* **80** (2013): 235-244
- Karim, H. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **411** (2011): 156-161
- Karrman, K. et al., *Br.J Haematol.* **144** (2009): 546-551
- Kasiappan, R. et al., *Mol.Cancer* **9** (2010): 311
- Katkoori, V. R. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e30020
- Kato, S. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 33-40
- Kaufman, H. L. et al., *Clin Cancer Res* **14** (2008): 4843-4849

- Kayser, G. et al., *Pathology* **43** (2011): 719-724
- Kelavkar, U. et al., *Curr.Urol.Rep.* **3** (2002): 207-214
- Kelavkar, U. P. et al., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **82** (2007): 185-197
- Khanna, A. et al., *Int.J Cancer* **138** (2016): 525-532
- Khanna, A. et al., *Cancer Res* **73** (2013): 6548-6553
- Khatamianfar, V. et al., *BMJ Open.* **2** (2012)
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients rd* (2000)
- Kim, D. S. et al., *J Proteome.Res* **9** (2010a): 3710-3719
- Kim, H. S. et al., *Korean J Intern.Med.* **25** (2010b): 399-407
- Kim, J. et al., *J Biol Chem* **286** (2011): 43294-43300
- Kim, J. H. et al., *J Prev.Med.Public Health* **49** (2016): 61-68
- Kim, J. W. et al., *Cancer Sci.* **100** (2009): 1468-1478
- Kim, J. Y. et al., *BMB.Rep.* **47** (2014a): 451-456
- Kim, K. et al., *Mol.Cancer Res* **6** (2008): 426-434
- Kim, S. M. et al., *Int.J Cancer* **134** (2014b): 114-124
- Kim, Y. D. et al., *Int.J Mol.Med.* **29** (2012): 656-662
- Kindla, J. et al., *Cancer Biol Ther.* **11** (2011): 584-591
- Kirschner, L. S. et al., *Horm.Cancer* **7** (2016): 9-16
- Kitchen, M. O. et al., *Epigenetics.* **11** (2016): 237-246
- Kiyomitsu, T. et al., *Mol.Cell Biol* **31** (2011): 998-1011
- Kleylein-Sohn, J. et al., *J Cell Sci.* **125** (2012): 5391-5402
- Klopfleisch, R. et al., *J Proteome.Res* **9** (2010): 6380-6391
- Knollman, H. et al., *Ther.Adv.Urol.* **7** (2015a): 312-330
- Knollman, H. et al., *Ther.Adv.Urol.* **7** (2015b): 312-330
- Kocer, B. et al., *Pathol.Int.* **52** (2002): 470-477
- Kohnz, R. A. et al., *ACS Chem Biol* **10** (2015): 1624-1630
- Kohonen-Corish, M. R. et al., *Oncogene* **26** (2007): 4435-4441
- Koido, S. et al., *World J Gastroenterol.* **19** (2013): 8531-8542

- Kong, D. S. et al., *Oncotarget*. (2016)
- Krackhardt, A. M. et al., *Blood* **100** (2002): 2123-2131
- Krieg, A. M., *Nat Rev. Drug Discov.* **5** (2006): 471-484
- Kronenberger, K. et al., *J Immunother.* **31** (2008): 723-730
- Krupenko, S. A. et al., *Cell Growth Differ.* **13** (2002): 227-236
- Kubota, T. et al., *Cell Cycle* **12** (2013): 2570-2579
- Kuchenbaecker, K. B. et al., *Nat Genet.* **47** (2015): 164-171
- Kuefer, M. U. et al., *Oncogene* **22** (2003): 1418-1424
- Kumar, A. et al., *Cell Biochem. Biophys.* **67** (2013): 837-851
- Kumar, R. et al., *DNA Repair (Amst)* **15** (2014): 54-59
- Kunimoto, K. et al., *J Cell Physiol* **220** (2009): 621-631
- Kuwada, M. et al., *Cancer Lett.* **369** (2015): 212-221
- Landi, D. et al., *Cancer* **118** (2012): 4670-4680
- Lanier, M. H. et al., *Mol. Biol. Cell* **26** (2015): 4577-4588
- Lee, D. G. et al., *Curr. Cancer Drug Targets.* **11** (2011): 966-975
- Lee, J. H. et al., *Ann. Surg.* **249** (2009a): 933-941
- Lee, K. Y. et al., *Yonsei Med. J* **50** (2009b): 60-67
- Lee, M. A. et al., *BMC. Cancer* **14** (2014a): 125
- Lee, S. Y. et al., *Eur. J. Cancer* **50** (2014b): 698-705
- Lee, W. C. et al., *J Immunother.* **28** (2005): 496-504
- Lei, N. et al., *Oncol Rep.* **32** (2014): 1689-1694
- Leitlinie Endometriumkarzinom, **032/034**, (2008)
- Leitlinie Magenkarzinom, **032-009OL**, (2012)
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)
- Leonetti, M. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **109** (2012): 19274-19279
- Leung, J. et al., *Immune. Netw.* **14** (2014): 265-276
- Li, J. et al., *Mol. Biol. Rep.* **41** (2014): 8071-8079
- Li, J. et al., *Zhongguo Fei. Ai. Za Zhi.* **18** (2015a): 16-22

- Li, J. et al., *Tumour.Biol* (2016)
- Li, J. F. et al., *Zhonghua Wei Chang Wai Ke.Za Zhi.* **15** (2012a): 388-391
- Li, L. et al., *Pharmacogenet.Genomics* **22** (2012b): 105-116
- Li, W. Q. et al., *Carcinogenesis* **34** (2013): 1536-1542
- Li, Y. et al., *Cancer Biol Ther.* **16** (2015b): 1316-1322
- Li, Y. et al., *Cancer Epidemiol.* **39** (2015c): 8-13
- Li, Y. F. et al., *Int.J Biol Sci.* **8** (2012c): 1168-1177
- Liang, Y. C. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 38046-38060
- Liao, W. et al., *Oncotarget.* **5** (2014): 10271-10279
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 980-987
- Lin, C. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 8434-8453
- Lin, J. C. et al., *RNA.* **20** (2014): 1621-1631
- Lin, Y. W. et al., *Eur.J Cancer* **45** (2009): 2041-2049
- Lin, Z. et al., *Diagn.Pathol.* **8** (2013): 133
- Lindqvist, B. M. et al., *Epigenetics.* **7** (2012): 300-306
- Linhares, N. D. et al., *Eur.J Med.Genet.* **57** (2014): 643-648
- Linher-Melville, K. et al., *Mol.Cell Biochem.* **405** (2015): 205-221
- Linkov, F. et al., *Eur.Cytokine Netw.* **20** (2009): 21-26
- Listerman, I. et al., *Cancer Res* **73** (2013): 2817-2828
- Liu, C. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **8** (2015): 7446-7449
- Liu, L. et al., *Biochem.J* **451** (2013a): 55-60
- Liu, M. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **14** (2013b): 6281-6286
- Liu, Q. et al., *Med.Oncol* **31** (2014a): 882
- Liu, T. et al., *DNA Repair (Amst)* **11** (2012): 131-138
- Liu, W. J. et al., *Leuk.Lymphoma* **55** (2014b): 2691-2698
- Liu, X. et al., *Mol.Biol Rep.* **41** (2014c): 7471-7478
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* **162** (1985): 1745-1759
- Lleonart, M. E. et al., *Oncol Rep.* **16** (2006): 603-608

- Llovet, J. M. et al., *N.Engl.J Med.* **359** (2008): 378-390
- Lobito, A. A. et al., *J Biol Chem* **286** (2011): 18969-18981
- Loddo, M. et al., *J Pathol.* **233** (2014): 344-356
- Lollini, P. L. et al., *Int.J Cancer* **55** (1993): 320-329
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., *Nat.Genet.* **45** (2013): 580-585
- Lu, G. et al., *Cancer Cell* **26** (2014): 222-234
- Lucas, S. et al., *Int.J Cancer* **87** (2000): 55-60
- Luhrig, S. et al., *Cell Div.* **8** (2013): 3
- Luis, Espinoza J. et al., *Cancer Sci.* **104** (2013): 657-662
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78** (1981): 2791-2795
- Lukka, H. et al., *Clin Oncol (R Coll.Radiol.)* **14** (2002): 203-212
- Luna, B. et al., *Mol.Neurobiol.* **52** (2015): 1341-1363
- Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* **3rd** (2004)
- Ma, J. et al., *Pathol.Oncol Res* **19** (2013a): 821-832
- Ma, L. D. et al., *Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi.* **21** (2013b): 1429-1434
- Ma, T. et al., *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* **94** (2014): 3005-3007
- Maggioni, A. et al., *Protein Expr.Purif.* **101** (2014): 165-171
- Mahomed, F., *Oral Oncol* **47** (2011): 797-803
- Mantel, A. et al., *Exp.Dermatol.* **23** (2014): 573-578
- Mantia-Smaldone, G. M. et al., *Hum.Vaccin.Immunother.* **8** (2012): 1179-1191
- Marchio, C. et al., *J Clin Pathol.* **63** (2010): 220-228
- Marechal, R. et al., *Clin Cancer Res* **15** (2009): 2913-2919
- Marine, J. C., *Nat Rev Cancer* **12** (2012): 455-464
- Markus, M. A. et al., *Genomics* **107** (2016): 138-144
- Marten, A. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **51** (2002): 637-644
- Martin, R. W. et al., *Cancer Res* **67** (2007): 9658-9665
- Martinez, I. et al., *Eur.J Cancer* **43** (2007): 415-432

- Marzec, K. A. et al., *Biomed.Res Int.* **2015** (2015): 638526
- Mason, C. C. et al., *Leukemia* (2015)
- Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* **41** (2015): 114-121
- Massoner, P. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e55207
- Matsueda, S. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 1657-1666
- Matsuura, N. et al., *Nihon Rinsho* **53** (1995): 1643-1647
- Maus, M. V. et al., *Blood* **123** (2014): 2625-2635
- Mayr, C. et al., *Exp.Hematol.* **34** (2006): 44-53
- Mayr, C. et al., *Blood* **105** (2005): 1566-1573
- McGilvray, R. W. et al., *Int.J Cancer* **127** (2010): 1412-1420
- Medeiros, A. C. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **3** (1994): 331-333
- Mehta, J. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0120622
- Mei, J. Z. et al., *Nan.Fang Yi.Ke.Da.Xue.Xue.Bao.* **27** (2007): 887-889
- Mencia, N. et al., *Biochem.Pharmacol.* **82** (2011): 1572-1582
- Mendoza-Maldonado, R. et al., *PLoS.One.* **5** (2010): e13720
- Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- Migliorini, D. et al., *J Clin Invest* **121** (2011): 1329-1343
- Milutin, Gasperov N. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0129452
- Missero, C. et al., *Exp.Dermatol.* **23** (2014): 143-146
- Miyagi, Y. et al., *Clin Cancer Res* **7** (2001): 3950-3962
- Miyamoto, K. et al., *Int.J Cancer* **116** (2005): 407-414
- Mohanraj, L. et al., *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **6** (2011): 166-177
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **72** (2013): 669-682
- Molina, J. R. et al., *Mayo Clin Proc.* **83** (2008): 584-594
- Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., *Transplantation* **64** (1997): 1017-1027
- Morin, P. J., *Cancer Res* **65** (2005): 9603-9606
- Morita, T. et al., *Int.J Cancer* **109** (2004): 525-532

- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Moser, J. J. et al., J Neurosci.Res **85** (2007): 3619-3631
- Mou, X. et al., Sci.Rep. **4** (2014): 6138
- Moulton, H. M. et al., Clin Cancer Res **8** (2002): 2044-2051
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480
- Mukhopadhyay, P. et al., Biochim.Biophys.Acta **1815** (2011): 224-240
- Muller, M. R. et al., Blood **103** (2004): 1763-1769
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638
- Nagashio, R. et al., Sci.Rep. **5** (2015): 8649
- Naito, T. et al., J Biol Chem **290** (2015): 15004-15017
- Nakajima, H. et al., Cancer Sci. **105** (2014): 1093-1099
- Nakano, K. et al., Exp.Cell Res **287** (2003): 219-227
- Nakarai, C. et al., Clin Exp.Med. **15** (2015): 333-341
- Nakashima, A. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **361** (2007): 218-223
- National Cancer Institute, (5-6-2015), [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)
- Nguyen, M. H. et al., Int.J Oncol **41** (2012): 1285-1296
- Ni, I. B. et al., Hematol.Rep. **4** (2012): e19
- Ni, L. et al., J Cell Biochem. **106** (2009): 920-928
- Nobusawa, S. et al., Brain Tumor Pathol. **31** (2014): 229-233
- O'Brien, S. et al., Lancet Oncol **15** (2014): 48-58
- O'Geen, H. et al., PLoS.Genet. **3** (2007): e89
- Obama, K. et al., Clin Cancer Res **14** (2008): 1333-1339
- Oehler, V. G. et al., Blood **114** (2009): 3292-3298
- Ogasawara, N. et al., J Biochem. **149** (2011): 321-330
- Ogbomo, H. et al., Neoplasia. **10** (2008): 1402-1410
- Ogiso, Y. et al., Cancer Res **62** (2002): 5008-5012
- Oh, Y. et al., J Biol.Chem **287** (2012): 17517-17529

- Okabe, N. et al., *Int.J Oncol* **46** (2015): 999-1006
- Okuno, K. et al., *Exp.Ther Med.* **2** (2011): 73-79
- Olkhanud, P. B. et al., *Cancer Res* **69** (2009): 5996-6004
- Olszewski-Hamilton, U. et al., *Biomark.Cancer* **3** (2011): 31-40
- Orentas, R. J. et al., *Front Oncol* **2** (2012): 194
- Orzol, P. et al., *Histol.Histopathol.* **30** (2015): 503-521
- Ouyang, M. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015): 132
- Ozawa, H. et al., *Ann.Surg.Oncol* **17** (2010): 2341-2348
- Ozeki, N. et al., *Int.J Mol.Sci.* **17** (2016)
- Palma, M. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **57** (2008): 1705-1710
- Palmer, D. H. et al., *Hepatology* **49** (2009): 124-132
- Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* **14** (2012): 433-440
- Pan, J. et al., *Leuk.Res* **36** (2012): 889-894
- Pannu, V. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 6076-6091
- Parikh, R. A. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **53** (2014): 25-37
- Parikh, S. A. et al., *Blood* **118** (2011): 2062-2068
- Parisi, M. A., *Am.J Med.Genet.C.Semin.Med.Genet.* **151C** (2009): 326-340
- Park, E. et al., *Mol.Cell* **50** (2013): 908-918
- Park, M. J. et al., *Immunol.Invest* **40** (2011): 367-382
- Park, Y. R. et al., *Cancer Genomics Proteomics.* **13** (2016): 83-90
- Parplys, A. C. et al., *DNA Repair (Amst)* **24** (2014): 87-97
- Pasmant, E. et al., *Mol.Med.* **17** (2011): 79-87
- Patil, A. A. et al., *Oncotarget.* **5** (2014): 6414-6424
- Pattabiraman, D. R. et al., *Leukemia* **27** (2013): 269-277
- Pawar, S. et al., *J Ovarian.Res* **7** (2014): 53
- Payne, S. R. et al., *Prostate* **69** (2009): 1257-1269
- Peng, B. et al., *Mol.Biosyst.* **11** (2015): 105-114
- Pequeux, C. et al., *Cancer Res* **62** (2002): 4623-4629

- Perrais, M. et al., *J Biol Chem* **276** (2001): 15386-15396
- Petrini, I., *Ann.Transl.Med.* **3** (2015): 82
- Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 289-297
- Phe, V. et al., *BJU.Int.* **104** (2009): 896-901
- Piasecka, D. et al., *Postepy Biochem.* **61** (2015): 198-206
- 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
- Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* **365** (2011): 725-733
- Potapenko, I. O. et al., *Mol.Oncol* **9** (2015): 861-876
- Przybyl, J. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol* **53** (2014): 505-513
- Qian, M. X. et al., *Cell* **153** (2013): 1012-1024
- Qiu, J. et al., *Leukemia* **17** (2003): 1891-1900
- Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol.* (2015)
- Qureshi, R. et al., *Cancer Lett.* **356** (2015): 321-331
- Rainer, J. et al., *Mol.Endocrinol.* **26** (2012): 178-193
- Raja, S. B. et al., *J Cell Sci.* **125** (2012): 703-713
- Rajadhyaksha, A. M. et al., *Am.J Hum.Genet.* **87** (2010): 643-654
- Rajkumar, T. et al., *BMC.Cancer* **11** (2011): 80
- Rakic, M. et al., *Hepatobiliary.Surg.Nutr.* **3** (2014): 221-226
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- Ramsay, R. G. et al., *Expert.Opin.Ther.Targets.* **7** (2003): 235-248
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Reid-Lombardo, K. M. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **20** (2011): 1251-1254
- Reinisch, W. et al., *J Immunother.* **25** (2002): 489-499
- Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* **140** (2015): 329-333
- Religio, A. et al., *PLoS.Genet.* **10** (2014): e1004338

- Rendon-Huerta, E. et al., *J Gastrointest.Cancer* **41** (2010): 52-59
- Resende, C. et al., *Helicobacter*. **16 Suppl 1** (2011): 38-44
- Richards, S. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **91** (1999): 861-868
- Ricke, R. M. et al., *Cell Cycle* **10** (2011): 3645-3651
- Rincon, R. et al., *Oncotarget*. **6** (2015): 4299-4314
- Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* **20** (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Riordan, J. D. et al., *PLoS.Genet.* **9** (2013): e1003441
- Ritter, A. et al., *Cell Cycle* **14** (2015): 3755-3767
- Robak, T. et al., *Expert.Opin.Biol.Ther* **14** (2014): 651-661
- Roca, H. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e76773
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* **1** (2006): 1120-1132
- Rodini, C. O. et al., *Int.J Oncol* **40** (2012): 1180-1188
- Rodriguez, F. J. et al., *J Neuropathol.Exp.Neurol.* **67** (2008): 1194-1204
- Romanuik, T. L. et al., *BMC.Med.Genomics* **3** (2010): 43
- Ronchi, C. L. et al., *Neoplasia.* **14** (2012): 206-218
- Rouanne, M. et al., *Crit Rev Oncol Hematol.* **98** (2016): 106-115
- Rucki, A. A. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 2237-2246
- Rudland, P. S. et al., *Am.J Pathol.* **176** (2010): 2935-2947
- Rutkowski, M. J. et al., *Mol Cancer Res* **8** (2010): 1453-1465
- Ryu, B. et al., *PLoS.One.* **2** (2007): e594
- S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, **032-010OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011)
- S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, **032-035OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Mammakarzinom, **032-045OL**, (2012)
- S3-Leitlinie Melanom, **032-024OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom, **043/022OL**, (2014)

- S3-Leitlinie Zervixkarzinom, **032/033OL**, (2014)
- Sadeque, A. et al., *BMC.Med.Genomics* **5** (2012): 59
- Saeki, M. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e67326
- Safarpour, D. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* **139** (2015): 612-617
- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Salim, H. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **52** (2013): 895-911
- Salman, B. et al., *Oncoimmunology.* **2** (2013): e26662
- Sandoval, J. et al., *J Clin Oncol* **31** (2013): 4140-4147
- Sangro, B. et al., *J Clin Oncol* **22** (2004): 1389-1397
- Sankaranarayanan, P. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0121396
- Santarlasci, V. et al., *Eur.J Immunol.* **44** (2014): 654-661
- Sarma, S. N. et al., *Environ.Toxicol.Pharmacol.* **32** (2011): 285-295
- Sasao, T. et al., *Reproduction.* **128** (2004): 709-716
- Satija, Y. K. et al., *Int.J Cancer* **133** (2013): 2759-2768
- Sato, N. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **49** (2010): 353-367
- Savaskan, N. E. et al., *Ann.Anat.* **192** (2010): 309-313
- Savaskan, N. E. et al., *Curr.Neuropharmacol.* **13** (2015): 258-265
- Sawada, G. et al., *Oncol Rep.* **30** (2013): 1971-1975
- Schetelig, J. et al., *J Clin Oncol* **26** (2008): 5094-5100
- Scheurer, B. et al., *Immunopharmacology* **38** (1997): 167-175
- Schmidt, S. M. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 1164-1170
- Schreiber, M. et al., *J Biol Chem* **273** (1998): 3509-3516
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- Seidl, C. et al., *Invest New Drugs* **28** (2010): 49-60
- Seppanen, M. et al., *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* **87** (2008): 902-909
- Shareef, M. M. et al., *Arab.J Gastroenterol.* **16** (2015): 105-112
- Sharma, R. K. et al., *Clin Exp.Metastasis* **33** (2016): 263-275
- Sharpe, D. J. et al., *Oncotarget.* **5** (2014): 8803-8815

- Shen, C. et al., *Cancer Res* **73** (2013): 3393-3401
- Shen, Y. et al., *Oncotarget*. **6** (2015a): 20396-20403
- Shen, Y. et al., *Cancer Cell Microenviron.* **2** (2015b)
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Sherman, S. K. et al., *Surgery* **154** (2013): 1206-1213
- Shi, M. et al., *World J Gastroenterol.* **10** (2004): 1146-1151
- Shi, Z. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015): 8519-8529
- Shimizu, F. et al., *Lab Invest* **83** (2003): 187-197
- Shioji, G. et al., *J Hum.Genet.* **50** (2005): 507-515
- Showel, M. M. et al., *F1000Prime.Rep.* **6** (2014): 96
- Siegel, S. et al., *Blood* **102** (2003): 4416-4423
- Siew, Y. Y. et al., *Int.Immunol.* **27** (2015): 621-632
- Silva, L. P. et al., *Anal.Chem.* **85** (2013): 9536-9542
- Silvestris, F. et al., *Adv.Exp.Med.Biol* **714** (2011): 113-128
- Singh, V. et al., *Curr.Cancer Drug Targets.* **13** (2013): 379-399
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 187-195
- Skawran, B. et al., *Mod.Pathol.* **21** (2008): 505-516
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094
- Smetsers, S. et al., *Fam.Cancer* **11** (2012): 661-665
- Smith, P. et al., *Clin Cancer Res* **13** (2007): 4061-4068
- Sohrabi, A. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 6745-6748
- Song, H. R. et al., *Mol.Carcinog* **52 Suppl 1** (2013): E155-E160
- Sonora, C. et al., *J Histochem.Cytochem.* **54** (2006): 289-299
- Spaner, D. E. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **54** (2005): 635-646
- Srivastava, N. et al., *Cancer Manag.Res.* **6** (2014): 279-289
- Stacey, S. N. et al., *Nat Commun.* **6** (2015): 6825
- Stahl, M. et al., *Ann.Oncol.* **24 Suppl 6** (2013): vi51-vi56
- Stangel, D. et al., *J Surg.Res* **197** (2015): 91-100

- Stein, U., *Expert Opin. Ther. Targets*. **17** (2013): 1039-1052
- Steinberg, R. L. et al., *Urol. Oncol* (2016a)
- Steinberg, R. L. et al., *Urol. Oncol* (2016b)
- Steinway, S. N. et al., *PLoS. One*. **10** (2015): e0128159
- Stenman, G. et al., *Cell Cycle* **9** (2010): 2986-2995
- Stevanovic, S. et al., *J Clin Oncol* **33** (2015): 1543-1550
- Stintzing, S., *F1000Prime.Rep*. **6** (2014): 108
- Stratakis, C. A. et al., *DNA Seq*. **9** (1998): 227-230
- Struyf, S. et al., *Am. J Pathol*. **163** (2003): 2065-2075
- Sturm, M. et al., *BMC. Bioinformatics*. **9** (2008): 163
- Su, Z. et al., *Cancer Res*. **63** (2003): 2127-2133
- Subhash, V. V. et al., *BMC. Cancer* **15** (2015): 550
- Sui, Y. et al., *Oncogene* **26** (2007): 822-835
- Sukocheva, O. A. et al., *World J Gastroenterol*. **21** (2015): 6146-6156
- Sun, S. et al., *Gene* **584** (2016): 90-96
- Sun, W. et al., *World J Gastroenterol*. **19** (2013): 2913-2920
- Sutherland, C. L. et al., *Blood* **108** (2006): 1313-1319
- Suzuki, N. et al., *J Orthop. Res* **32** (2014): 915-922
- Tabares-Seisdedos, R. et al., *Mol. Psychiatry* **14** (2009): 563-589
- Takahashi, M. et al., *Int. J Oncol* **27** (2005): 1483-1487
- Takatsu, H. et al., *J Biol Chem* **286** (2011): 38159-38167
- Takayama, M. A. et al., *Genes Cells* **5** (2000a): 481-490
- Takayama, T. et al., *Cancer* **68** (1991): 2391-2396
- Takayama, T. et al., *Lancet* **356** (2000b): 802-807
- Taketani, T. et al., *Cancer Res* **62** (2002): 33-37
- Tang, C. et al., *Int. J Clin Exp. Pathol*. **7** (2014): 4782-4794
- Tatenhorst, L. et al., *J Neuropathol. Exp. Neurol*. **63** (2004): 210-222
- Taverniti, V. et al., *Nucleic Acids Res* **43** (2015): 482-492

- Taylor, M. et al., *Breast Cancer Res* **9** (2007): R46
- Terabayashi, T. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e39714
- Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **23** (2014): 1985-1996
- Tian, Y. et al., *Diagn.Pathol.* **9** (2014): 42
- Ting, L. et al., *DNA Repair (Amst)* **9** (2010): 1241-1248
- Toda, M. et al., *Meta Gene* **2** (2014): 686-693
- Toomey, P. G. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 32-42
- Torelli, G. F. et al., *Haematologica* **99** (2014): 1248-1254
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- Tsujikawa, T. et al., *Int.J Cancer* **132** (2013): 2755-2766
- Tumova, L. et al., *Mol.Cancer Ther.* **13** (2014): 812-822
- Urata, Y. N. et al., *Sci.Rep.* **5** (2015): 13676
- Ushiku, T. et al., *Histopathology* **61** (2012): 1043-1056
- Utrera, R. et al., *EMBO J* **17** (1998): 5015-5025
- Vainio, P. et al., *Am.J Pathol.* **178** (2011a): 525-536
- Vainio, P. et al., *Oncotarget.* **2** (2011b): 1176-1190
- Valque, H. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e46699
- van de Klundert, M. A. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e48940
- Van Ginkel, P. R. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1448** (1998): 290-297
- van Muijen, G. N. et al., *Recent Results Cancer Res* **139** (1995): 105-122
- Van, Seuning, I et al., *Biochem.J* **348 Pt 3** (2000): 675-686
- Vater, I. et al., *Leukemia* **29** (2015): 677-685
- Ventela, S. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 144-158
- Verreman, K. et al., *Biochem.J* **439** (2011): 469-477
- Vici, P. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* **33** (2014): 29
- Von Hoff, D. D. et al., *N.Engl.J Med.* **369** (2013): 1691-1703
- von Rundstedt, F. C. et al., *Transl.Androl Urol.* **4** (2015): 244-253

- Wallrapp, C. et al., *Ann.Oncol* **10 Suppl 4** (1999): 64-68
- Walsh, M. D. et al., *Mod.Pathol.* **26** (2013): 1642-1656
- Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Walton, E. L. et al., *Biology.(Basel)* **3** (2014): 578-605
- Wan, W. et al., *World J Surg.Oncol* **12** (2014): 185
- Wang, C. et al., *Nucleic Acids Res* **43** (2015a): 4893-4908
- Wang, C. Q. et al., *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.* **117** (2014a): 353-360
- Wang, D. et al., *Chin Med.Sci.J* **14** (1999a): 107-111
- Wang, G. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015b): 1055-1065
- Wang, G. H. et al., *Oncol Lett.* **5** (2013a): 544-548
- Wang, H. et al., *Carcinogenesis* **30** (2009a): 1314-1319
- Wang, J. et al., *Ann.Surg.Oncol* **22** (2015c): 685-692
- Wang, J. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* **34** (2015d): 13
- Wang, J. W. et al., *Oncogene* **23** (2004): 4089-4097
- Wang, L. et al., *J Cutan.Pathol.* **42** (2015e): 361-367
- Wang, L. et al., *Mol.Biol Rep.* **38** (2011a): 229-236
- Wang, L. et al., *Diagn.Pathol.* **8** (2013b): 190
- Wang, N. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **283** (2011b): 103-108
- Wang, Q. et al., *Cell* **138** (2009b): 245-256
- Wang, Q. et al., *BMC.Cancer* **11** (2011c): 271
- Wang, Q. et al., *Onco.Targets.Ther.* **8** (2015f): 1971-1977
- Wang, Q. et al., *PLoS.One.* **8** (2013c): e61640
- Wang, R. et al., *Mol.Cell Biochem.* **405** (2015g): 97-104
- Wang, S. et al., *J Cell Sci.* **120** (2007): 567-577
- Wang, W. Z. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* **29** (2010): 140
- Wang, X. W. et al., *Gut Liver* **8** (2014b): 487-494
- Wang, X. Z. et al., *Oncogene* **18** (1999b): 5718-5721

- Wang, Y. et al., *Cancer Cell* **26** (2014c): 374-389
- Wang, Y. P. et al., *Ai.Zheng.* **27** (2008): 243-248
- Wang, Z. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* **141** (2015h): 1353-1361
- Wang, Z. et al., *Oncotarget.* (2016)
- Wang, Z. et al., *Glycobiology* **22** (2012): 930-938
- Watanabe, N. et al., *J Biol Chem* **278** (2003): 26102-26110
- Watts, C. A. et al., *Chem Biol* **20** (2013): 1399-1410
- Wells, J. et al., *J Biol Chem* **284** (2009): 29125-29135
- Weng, Y. R. et al., *Carcinogenesis* **35** (2014): 1389-1398
- Wheler, J. J. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015): 442
- Whitaker, H. C. et al., *Oncogene* **33** (2014): 5274-5287
- Wierda, W. G. et al., *Blood* **118** (2011): 5126-5129
- Wierinckx, A. et al., *Endocr.Relat Cancer* **14** (2007): 887-900
- Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 7099-7109
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Williams, G. L. et al., *Cell Cycle* **6** (2007): 1699-1704
- Wilson, P. M. et al., *Nat Rev.Clin Oncol* **11** (2014): 282-298
- Wilzen, A. et al., *Int.J Oncol* **34** (2009): 697-705
- Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- Wlcek, K. et al., *Cancer Biol Ther.* **11** (2011): 801-811
- Wong, R. P. et al., *Pigment Cell Melanoma Res* **25** (2012): 213-218
- World Cancer Report, (2014)
- World Health Organization, (2014), <http://www.who.int/en/>
- Wu, J. et al., *ACS Chem Biol* **8** (2013): 2201-2208
- Wu, Y. et al., *Cancer Lett.* **356** (2015): 646-655
- Xie, B. et al., *Pathol.Oncol Res* **19** (2013): 611-617
- Xie, C. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **445** (2014): 263-268
- Xiong, D. et al., *Carcinogenesis* **33** (2012): 1797-1805

- Xu, X. et al., *Oncogene* **26** (2007): 7371-7379
- Xu, X. et al., *J Biol Chem* **289** (2014): 8881-8890
- Xue, J. H. et al., *Acta Pharmacol.Sin.* **32** (2011): 1019-1024
- Yamada, T. et al., *Br.J Cancer* **108** (2013): 2495-2504
- Yamashita, J. et al., *Acta Derm.Venereol.* **92** (2012): 593-597
- Yamazoe, S. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* **29** (2010): 53
- Yan-Chun, L. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* (2015)
- Yan-Fang, T. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0126566
- Yang, J. J. et al., *Haematologica* **99** (2014a): e11-e13
- Yang, L. et al., *J Biol Chem* **291** (2016): 3905-3917
- Yang, L. et al., *PLoS.One.* **10** (2015a): e0133896
- Yang, T. T. et al., *Sci.Rep.* **5** (2015b): 14096
- Yang, Y. et al., *Oncol Lett.* **9** (2015c): 1833-1838
- Yang, Y. et al., *PLoS.One.* **9** (2014b): e97578
- Yang, Y. M. et al., *Cancer Sci.* **102** (2011): 1264-1271
- Yao, Y. et al., *Cell Physiol Biochem.* **35** (2015): 983-996
- Ye, B. G. et al., *Oncotarget.* (2016)
- Yeh, I. et al., *Nat.Commun.* **6** (2015): 7174
- Yeh, S. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** (2000): 11256-11261
- Yonezawa, S. et al., *Pathol.Int.* **49** (1999): 45-54
- Yoshimaru, T. et al., *Nat Commun.* **4** (2013): 2443
- Yoshimaru, T. et al., *Sci.Rep.* **4** (2014): 7355
- Young, A. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014): 808
- Yu, C. J. et al., *Int.J Cancer* **69** (1996): 457-465
- Yu, H. et al., *Nat Chem Biol* **11** (2015a): 847-854
- Yu, T. et al., *Cell Res* **24** (2014): 1214-1230
- Yu, X. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015b): 967-972
- Yuan, M. et al., *Oncotarget.* **5** (2014): 2820-2826

- Zaganjor, E. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **111** (2014): 10568-10573
- Zamuner, F. T. et al., Mol.Cancer Ther. **14** (2015): 828-834
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zavala-Zendejas, V. E. et al., Cancer Invest **29** (2011): 1-11
- Zekri, A. R. et al., BMC.Res Notes **1** (2008): 106
- Zeng, B. et al., Curr.Cancer Drug Targets. **13** (2013a): 103-116
- Zeng, S. et al., Eur.J Cancer **49** (2013b): 3752-3762
- Zeng, X. et al., Ai.Zheng. **26** (2007): 1080-1084
- Zeng, X. X. et al., Eur.Rev Med.Pharmacol.Sci. **19** (2015): 4353-4361
- Zhan, W. et al., PLoS.One. **10** (2015): e0142596
- Zhang, B. et al., J Huazhong.Univ Sci.Technolog.Med.Sci. **30** (2010a): 322-325
- Zhang, G. et al., BMC.Cancer **14** (2014): 310
- Zhang, J. et al., Theor.Biol Med.Model. **9** (2012a): 53
- Zhang, Q. et al., Zhongguo Fei.Ai.Za Zhi. **13** (2010b): 612-616
- Zhang, W. et al., Clin Cancer Res **7** (2001): 822s-829s
- Zhang, W. et al., Biochem.J (2016)
- Zhang, X. et al., EMBO J **30** (2011): 2177-2189
- Zhang, X. et al., Med.Oncol **32** (2015): 148
- Zhang, X. et al., Int.J Med.Sci. **10** (2013a): 1795-1804
- Zhang, Y. et al., Gene **497** (2012b): 93-97
- Zhang, Y. et al., J Ovarian.Res **6** (2013b): 55
- Zhao, J. et al., Int.J Med.Sci. **11** (2014a): 1089-1097
- Zhao, J. G. et al., FEBS Lett. **588** (2014b): 4536-4542
- Zhen, T. et al., Oncotarget. **5** (2014): 3756-3769
- Zheng, M. et al., Breast Cancer Res Treat. **148** (2014): 423-436
- Zheng, M. Z. et al., J Transl.Med. **5** (2007): 36
- Zhong, M. et al., Mol.Cancer Res **8** (2010): 1164-1172
- Zhong, T. et al., Biomed.Pharmacother. **69** (2015): 317-325

- Zhou, X. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* **141** (2015): 961-969
- Zhou, Y. et al., *Front Biosci.(Landmark.Ed)* **16** (2011): 1109-1131
- Zhou, Z. et al., *Gastroenterology* **147** (2014): 1043-1054
- Zhu, H. H. et al., *Asian Pac.J Trop.Med.* **7** (2014): 488-491
- Zhu, J. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **8** (2015a): 9479-9486
- Zhu, P. et al., *Oncol Lett.* **10** (2015b): 1487-1494
- Zigelboim, I. et al., *J Clin Oncol* **27** (2009): 3091-3096
- Zimmerman, K. M. et al., *Mol.Cancer Res* **11** (2013): 370-380
- Zocchi, M. R. et al., *Blood* **119** (2012): 1479-1489
- Zou, J. X. et al., *Mol.Cancer Res* **12** (2014): 539-549
- Zou, T. T. et al., *Oncogene* **21** (2002): 4855-4862

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID No. 171, или SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 170, или SEQ ID No. 172 по SEQ ID No. 388; или его фармацевтически приемлемая соль, где указанный пептид имеет длину до 16 аминокислот.
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 молекулой МНС, в состоянии распознаваться Т-клетками CD4 и/или CD8.
3. Пептид или его соль по любому из пп. 1–2, где указанный пептид или его соль имеет общую длину до 12 аминокислот, или где пептид состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с любой из SEQ ID No. 171, или SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 170, или SEQ ID No. 172 по SEQ ID No. 388.
4. Пептид или его соль по любому из пп. 1–3, где указанный пептид включает непептидные связи.
5. Т-клеточный рецептор, растворимый или связанный с мембраной, или его фрагмент, который специфически связывается с HLA-лигандом, причем указанный лиганд является пептидом по любому из пп. 1–4, или пептидом по любому из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.
6. Т-клеточный рецептор по п. 5, где указанный Т-клеточный рецептор представлен в виде растворимой молекулы и несет дополнительную эффекторную функцию, такую как иммуностимулирующий домен или токсин.
7. Антитело, растворимое или связанное с мембраной, или его фрагмент, которое специфически распознает пептид по любому из пп. 1–4, или пептид по любому из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.
8. Рекombинантная клетка-хозяин, включающая пептид по любому из пп. 1–4, Т-клеточный рецептор или его фрагмент по п. 5 или 6, или антитело или его фрагмент по п. 7.

9. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.8, где указанная клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка, Т-клетка или НК-клетка.
10. Применение пептида или его соли по любому из пп. 1–4, или рекомбинантной клетки-хозяина по п.8 или 9 в медицине или в качестве лекарственного средства.
11. Способ получения пептида по любому из пп. 1–4, Т-клеточного рецептора или его фрагмента по п.5 или 6, или антитела или его фрагмента по п.7, где способ включает культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по п. 8 или 9 и выделение пептида, Т-клеточного рецептора или его фрагмента, или антитела или его фрагмента из клетки-хозяина или его культуральной среды.
12. 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. 1–3.
13. Активированный Т-лимфоцит, который селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, данную в любом из пп. 1–3.
14. Способ уничтожения раковых клеток-мишеней у пациента, у которого раковые клетки-мишени презентуют полипептид согласно в любому из пп. 1–3, где способ включает введение пациенту эффективного числа активированных Т-клеток, как определено в п. 13.
15. Применение пептида по любому из пп. 1–4, рекомбинантной клетки по п. 8 или 9, активированного Т-лимфоцита по п. 13, или антитела или его фрагмента по п. 7, или Т-клеточного рецептора или его фрагмента по п.5 или 6, в диагностике и/или лечении рака или в изготовлении лекарственного средства против рака.
16. Применение по п. 15, где указанный рак выбран из группы: глиобластома, рак молочной железы, колоректальный рак, почечноклеточная карцинома, хронический

лимфоцитарный лейкоз, гепатоклеточная карцинома, немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких, неходжкинская лимфома, острый миелолейкоз, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак пищевода, в том числе рак пищеводно-желудочного перехода, рак желчного пузыря и холангиокарцинома, меланома, рак желудка, рак яичка, рак мочевого пузыря или рак матки и другие опухоли, которые демонстрируют избыточную презентацию пептида, состоящего из SEQ ID No. 171, или SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 170, или SEQ ID No. 172 по SEQ ID No. 388.

17. Способ получения персонализированной противораковой вакцины или медикаментозного и/или клеточного терапевтического агента для отдельного пациента, где указанный способ включает:
  - а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом указанного отдельного пациента;
  - б) сравнение пептидов, идентифицированных на этапе а), с хранилищем пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в опухолях по сравнению с нормальными тканями;
  - в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища, который соответствует пептиду TUMAP, идентифицированному у пациента; и
  - г) приготовление лекарственной формы персонализированной вакцины или препарата для медикаментозной или клеточной терапии на основании этапа в), где указанное хранилище включает пептид, имеющий последовательность SEQ ID No. 171, или SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 170, SEQ ID No. 172 по SEQ ID No. 388.
  
18. Способ по п. 17, где указанные пептиды TUMAP идентифицируют с помощью:
  - а1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными образца нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или aberrantly; и
  - а2) установление 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 aberrantly экспрессируемых опухолью.

19. Способ по п. 17 или п. 18, где последовательности лигандов МНС идентифицируют с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов.
20. Способ по любому из пп. 17-19, где нормальную ткань, соответствующую типу ткани опухолевого образца, получают у одного и того же пациента.
21. Способ по любому из пп. 17-20, где пептиды, включенные в хранилище, идентифицируют на основании следующих этапов:
  - аа. Проведение анализа экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома с помощью методов с высокой степенью параллелизма, таких как выявление профилей экспрессии на основе микрочипов или секвенирования, включающих идентификацию генов, которые в избытке экспрессируются в злокачественной ткани по сравнению с нормальной тканью или тканями;
  - аб. Выбор пептидов, обнаруженных на этапе аа., которые кодируются генами, экспрессируемыми селективно или в избытке, и
  - ав. Определение индукции *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, включая анализ иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров или указанного пациента; или
  - ба. Идентификация НЛA-лигандов из указанного опухолевого образца с помощью масс-спектрометрии;
  - бб. Проведение анализа экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома с помощью методов с высокой степенью параллелизма, таких как выявление профилей экспрессии на основе микрочипов или секвенирования, включающих идентификацию генов, которые в избытке экспрессируются в злокачественной ткани по сравнению с нормальной тканью или тканями;
  - бв. Сравнение идентифицированных НЛA-лигандов с данными экспрессии указанных генов;
  - бг. Выбор пептидов, которые кодируются генами, экспрессируемыми селективно или в избытке, обнаруженными на этапе бв.;
  - бд. Повторное обнаружение отобранных пептидов TUMAP этапа бг. на опухолевой ткани и нечастое обнаружение или их отсутствие на здоровых тканях и подтверждение релевантности избыточной экспрессии на уровне мРНК; и

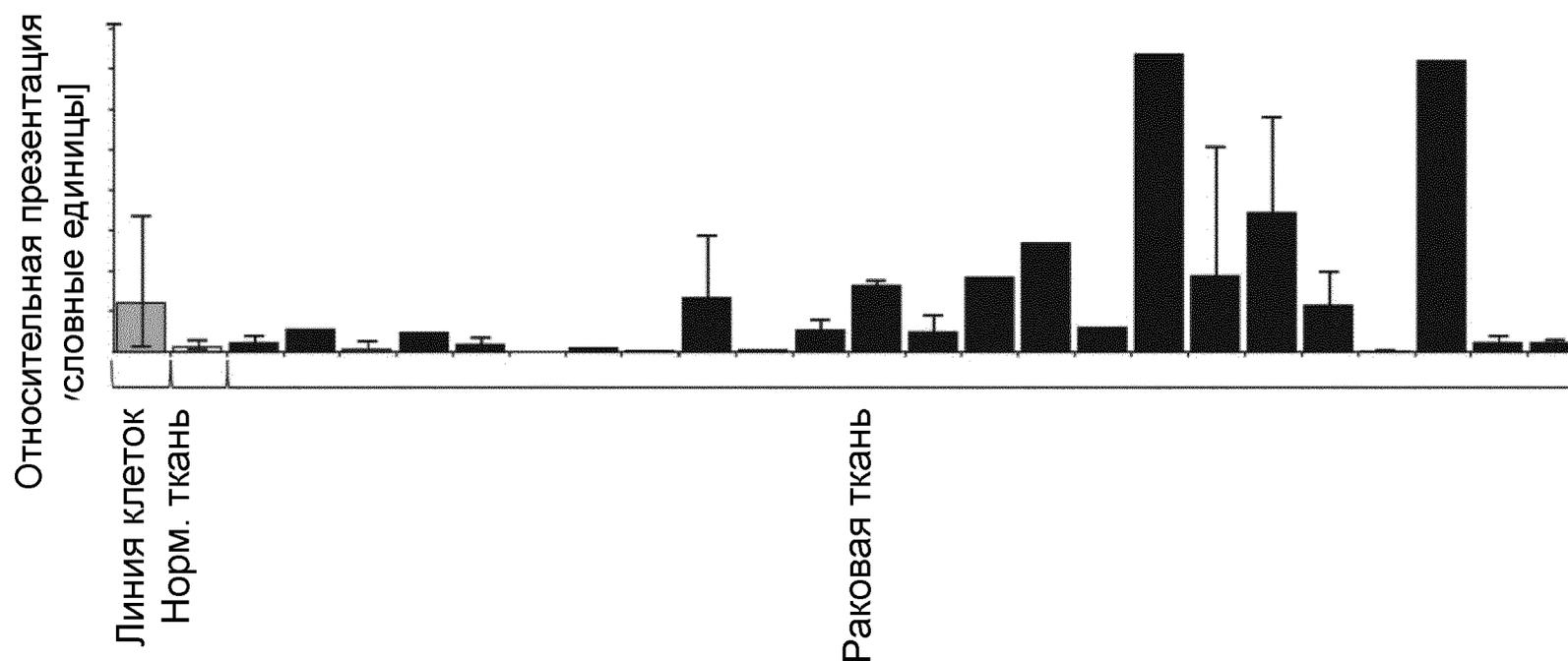
бе. Определение индукции *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, включая анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров или указанного пациента.

22. Способ по любому из пп. 17-21, где иммуногенность пептидов, включенных в хранилище, определяют способом, включающим анализ иммуногенности *in vitro*, контроль иммунного статуса пациента на наличие связывания отдельных пептидов с молекулами HLA, окрашивание МНС-мультимеров, анализ методом ELISPOT и/или внутриклеточное окрашивание цитокинов.
23. Способ по любому из пп. 17-22, дополнительно включающий идентификацию по меньшей мере одной мутации, являющейся уникальной для опухолевого образца по сравнению с нормальной соответствующей тканью отдельного пациента, и выбор пептида, который коррелирует с мутацией, для включения в вакцину или получения средств клеточной терапии.
24. Способ по п. 23, где указанную по меньшей мере одну мутацию идентифицируют методом полногеномного секвенирования.
25. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида или его соли по любому из пп. 1–4, Т-клеточного рецептора или его фрагмента по п. 5 или 6, антитела или его фрагмента по п. 7, рекомбинантной клетки-хозяина по п. 8 или п.9 или активированного Т-лимфоцита по п. 13, и фармацевтически приемлемый носитель и/или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.
26. Фармацевтическая композиция по п.25, включающая активированный Т-лимфоцит по п.13, и дополнительно содержащая один или более адъювантов, выбранных из интерлейкина и иммуноадъюванта.
27. Фармацевтическая композиция по п. 26, где а) интерлейкин представляет собой ИЛ-2; и/или б) иммуноадъювант представляет собой ИЛ-15.

Фигура 1А

Пептид: LLLPLLPLPSLГ (A\*02)

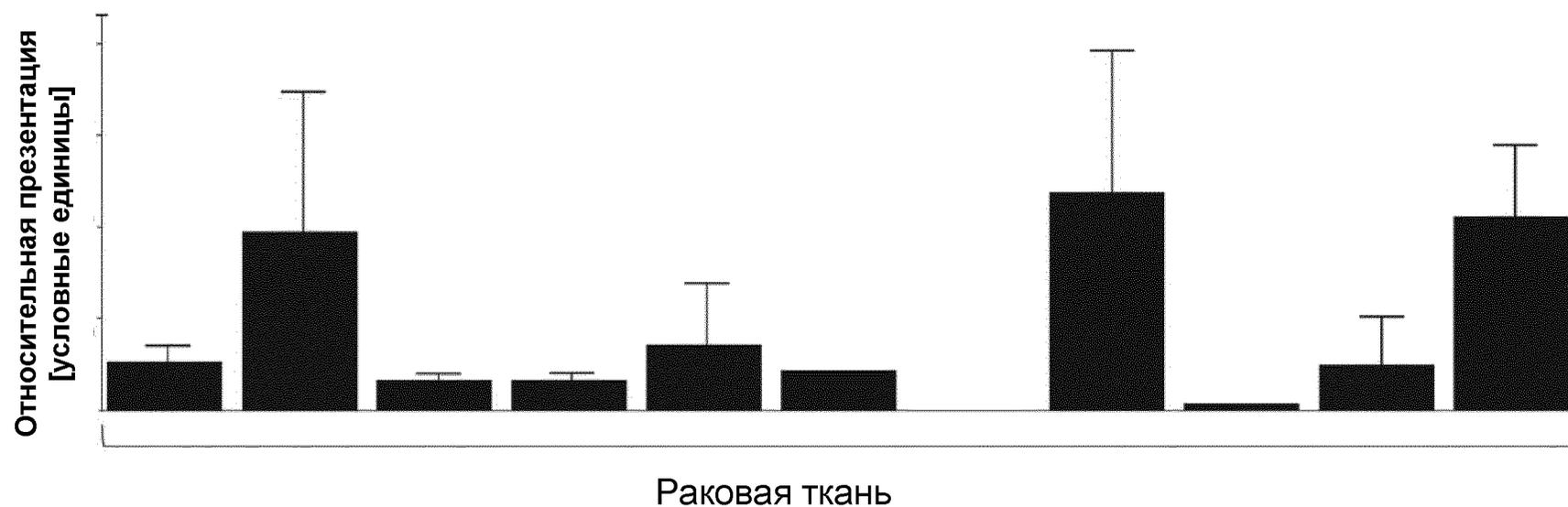
SEQ ID NO: 33



Пептид, выявленный на

1 клеточная линия (1 поджелудочная железа), 1 нормальная ткань (1 щитовидная железа), 22 раковые ткани (5 раков головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак толстой кишки, 1 рак пищевода, 1 рак желчного пузыря, 1 рак печени, 10 раков легких, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак желудка) (слева направо)

Фигура 1В  
Пептид: NYIPVKNGKQF (A\*24)  
SEQ ID NO: 103

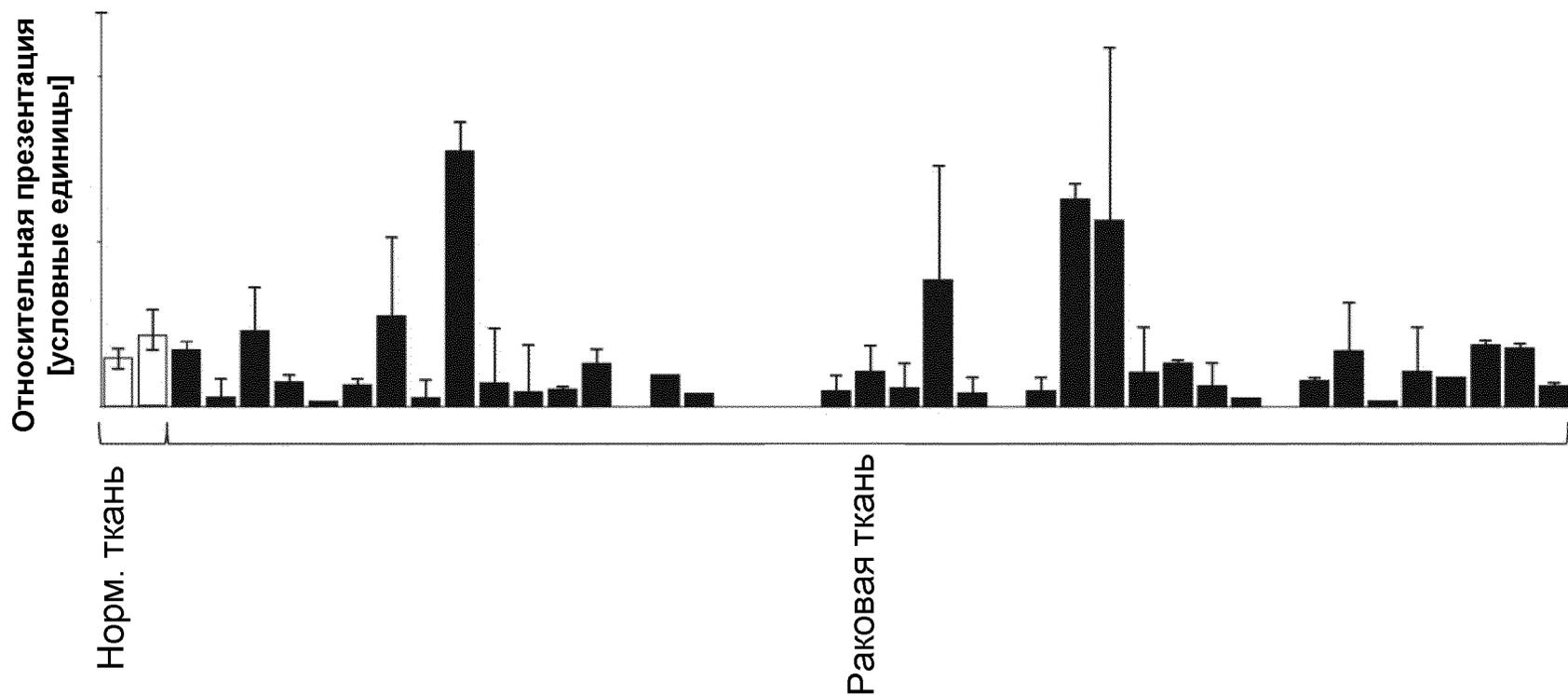


Пептид, выявленный на  
11 раковых тканях (1 рак головного мозга, 1 рак печени, 8 раков легких, 1 рак предстательной  
железы) (слева направо)

Фигура 1С

Пептид: EYLDRIGQLFF (A\*24)

SEQ ID NO: 131



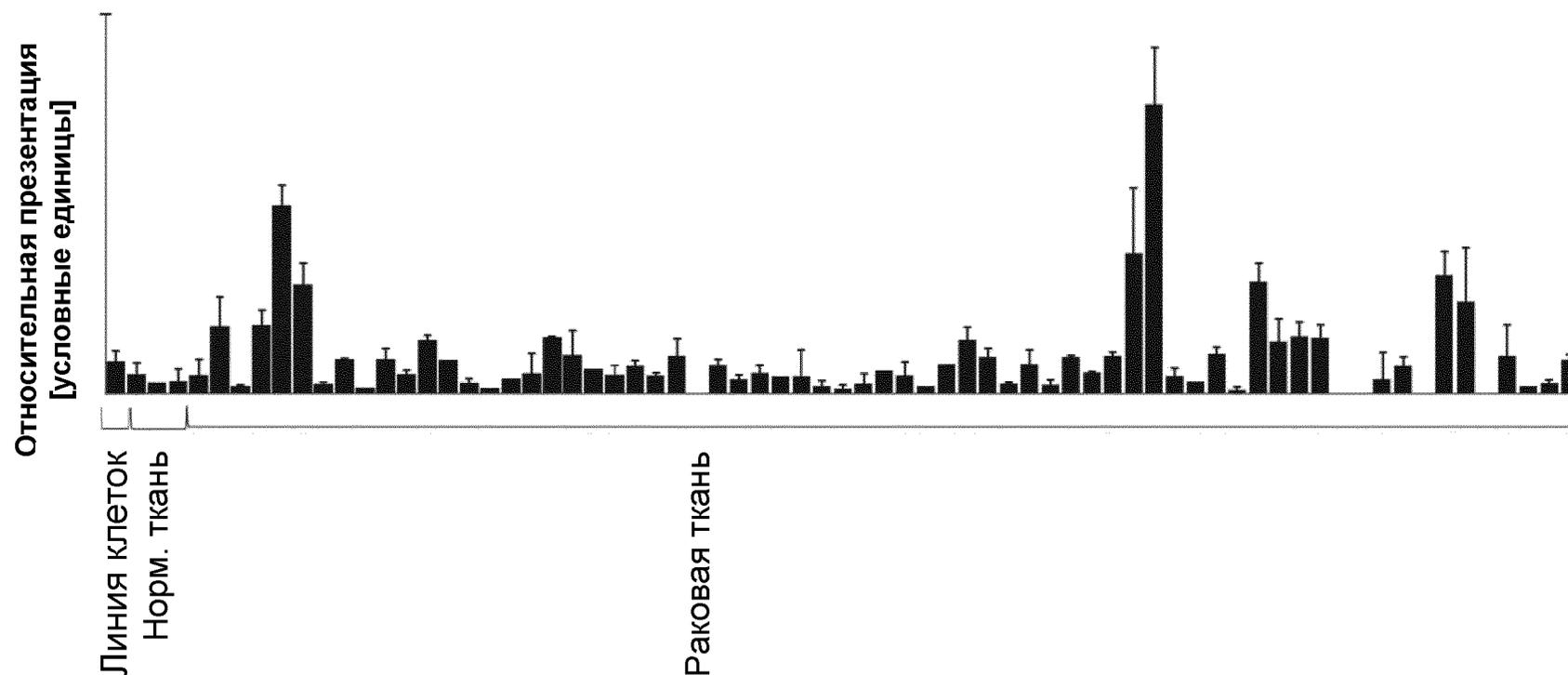
Пептид, выявленный на

2 нормальные ткани (1 почка, 1 легкое), 41 раковая ткань (2 рака головного мозга, 1 рак почек, 3 рака печени, 29 раков легких, 2 рака предстательной железы, 4 рака желудка) (слева направо)

Фигура 1D

Пептид: FYINGQYQF (A\*24)

SEQ ID NO: 176



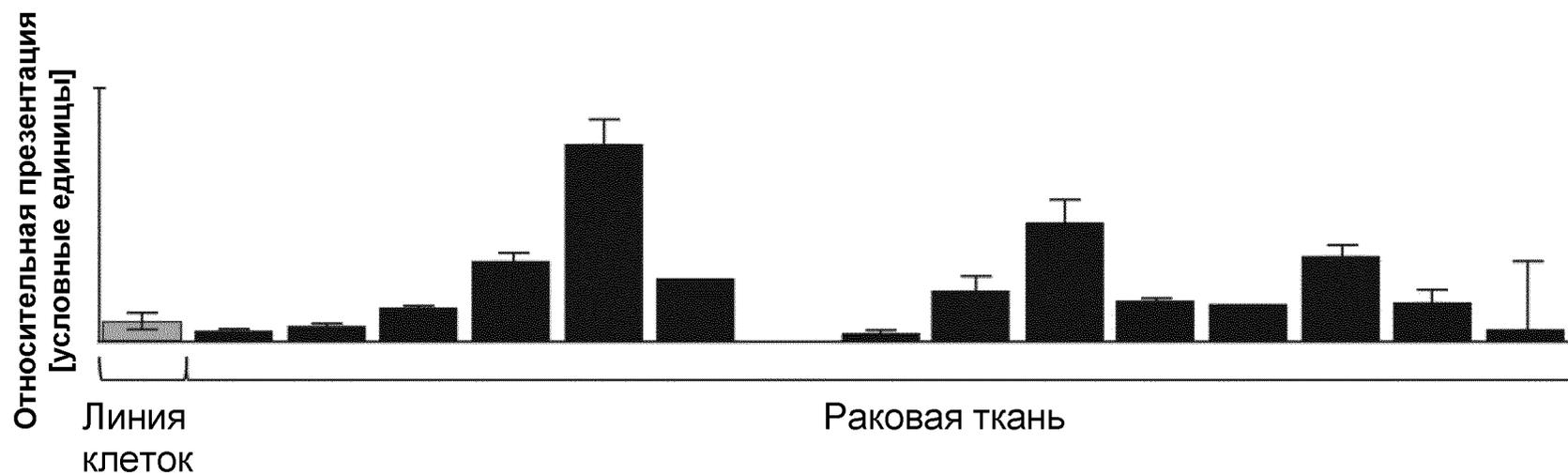
Пептид, выявленный на

1 доброкачественная гиперплазия предстательной железы, 3 нормальные ткани (1 почка, 1 гипофиз, 1 кожа), 67 раковых тканей (4 рака головного мозга, 2 рака печени, 42 рака легких, 12 раков предстательной железы, 7 раков желудка) (слева направо)

Фигура 1Е

**Пептид: HLYNNEEQV (A\*02)**

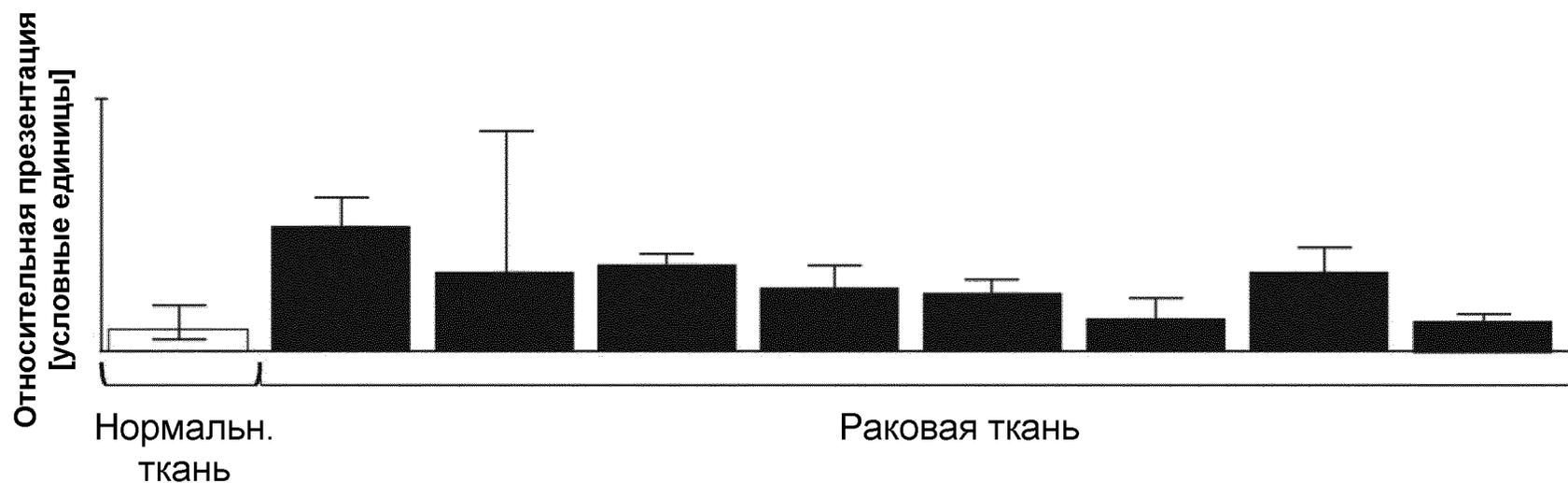
**SEQ ID NO: 16**



Пептид, выявленный на

1 клеточная линия (поджелудочная железа), 15 раковых тканей (1 рак желчного протока, 1 рак пищевода, 6 раков печени, 5 раков легких, 2 раков мочевого пузыря) (слева направо)

Фигура 1F  
Пептид: YVLPKLYVKL (A\*02)  
SEQ ID NO: 35

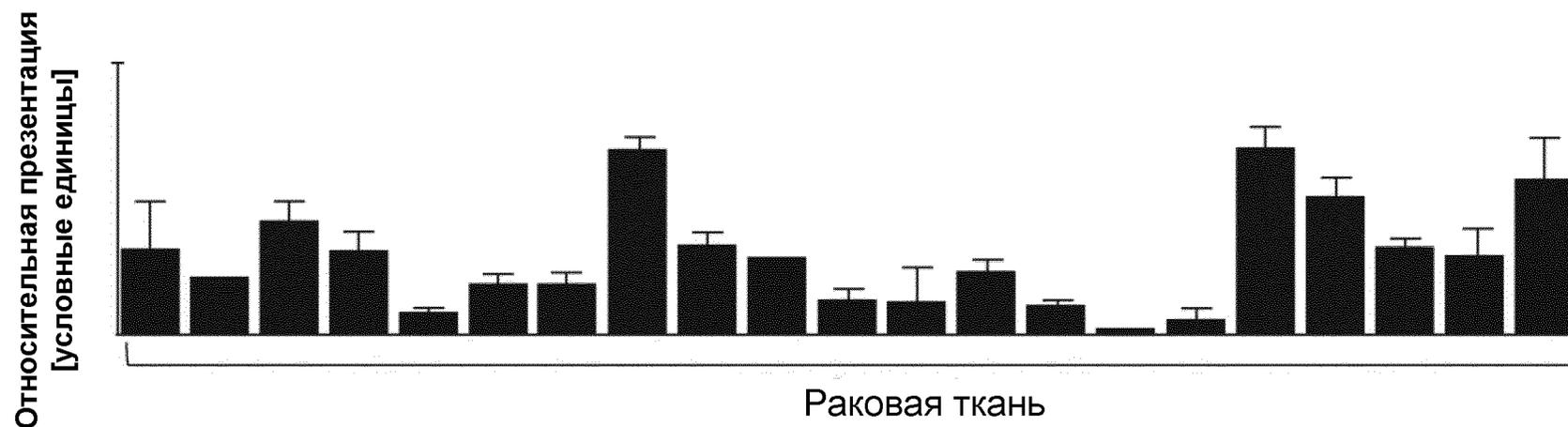


Пептид, выявленный на  
1 нормальной ткани (1 образец лейкоцитов), 8 раковых тканях (1 рак головы и шеи, 3 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак желчного пузыря, 1 рак толстой кишки, 1 рак лимфатического узла) (слева направо)

Фигура 1G

Пептид: SLLALPQDLQA (A\*02)

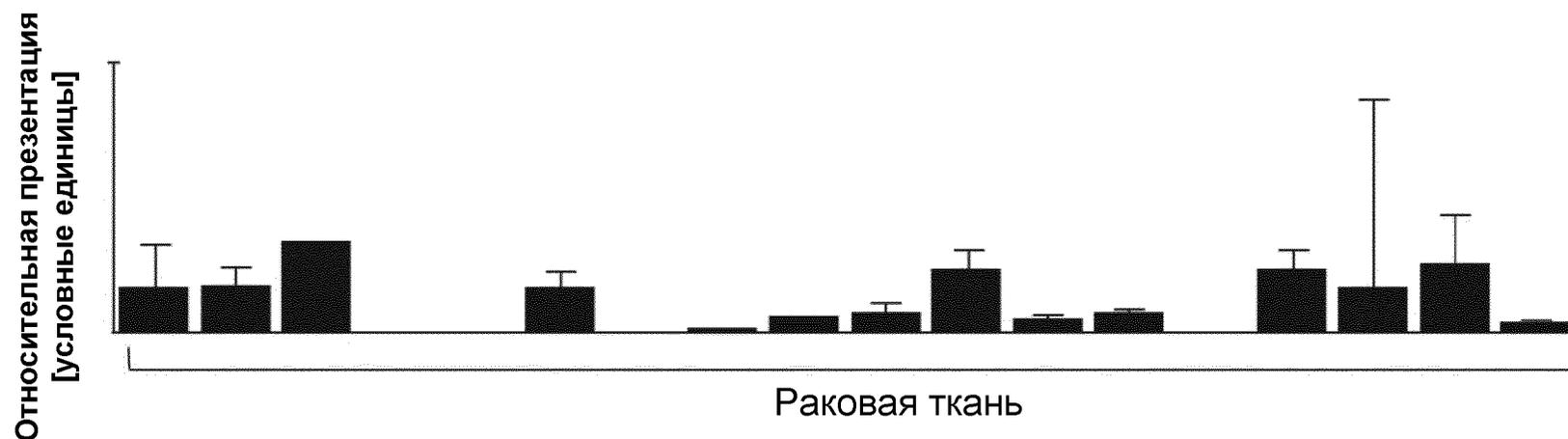
SEQ ID NO: 40



Пептид, выявленный на

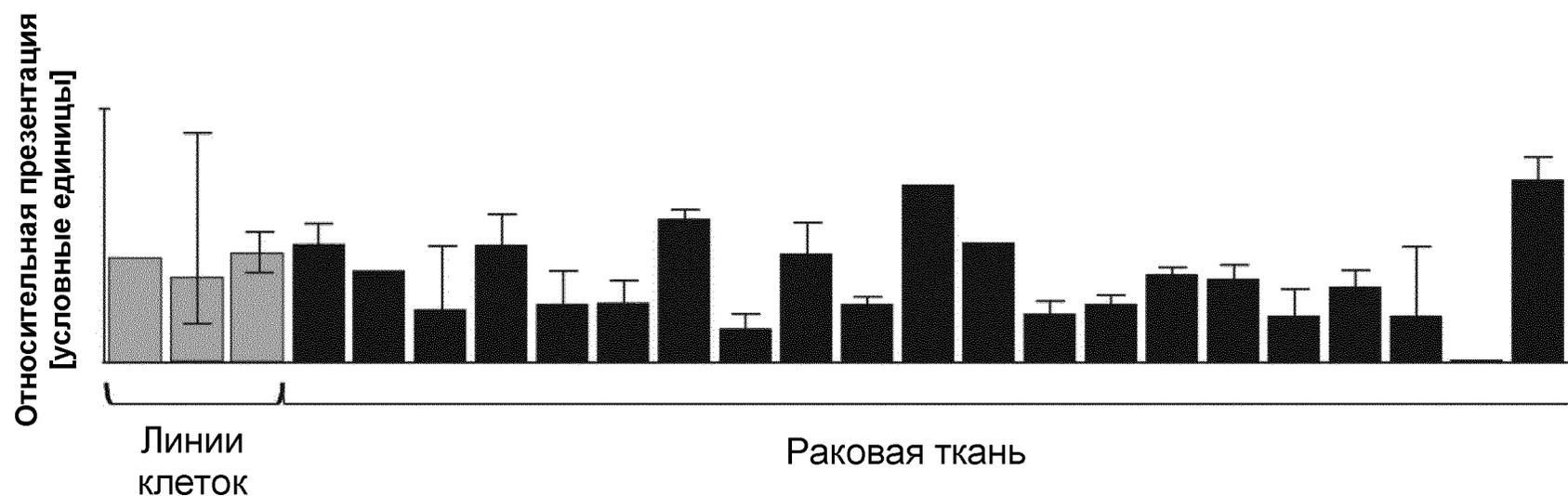
21 раковая ткань (1 рак желчного протока, 1 рак молочной железы, 3 рака толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 6 раков легких, 2 рака яичника, 1 рак предстательной железы, 3 рака мочевого пузыря, 3 рака матки) (слева направо)

Фигура 1H  
Пептид: VLSPFILTL (A\*02)  
SEQ ID NO: 42



Пептид, выявленный на  
18 раковых тканях (1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак молочной железы, 1 рак почки, 6 раков легких, 3 рака лимфатических узлов, 2 рака яичника, 2 рака мочевого пузыря, 1 рак матки) (слева направо)

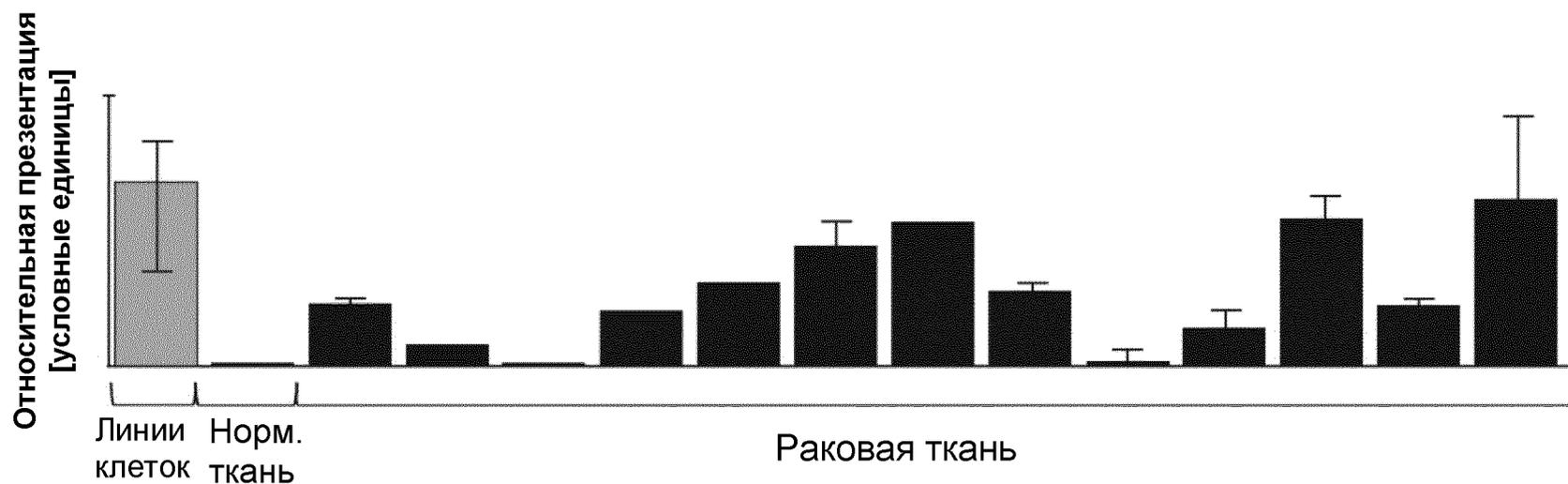
Фигура 11  
**Пептид: SLLSHVIVA (A\*02)**  
**SEQ ID NO: 53**



Пептид, выявленный на

3 клеточные линии (1 линия клеток крови, 2 поджелудочные железы), 21 раковая ткань (1 рак головы и шеи, 1 рак желчного протока, 2 лейкоцитарных лейкоза, 1 молочной железы, 2 рака пищевода, 1 рак желчного пузыря, 1 рак почки, 1 рак печени, 2 рака легких, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак яичника, 3 рака кожи, 1 рак мочевого пузыря) (слева направо)

Фигура 1J  
Пептид: FITDFYTTV (A\*02)  
SEQ ID NO: 66

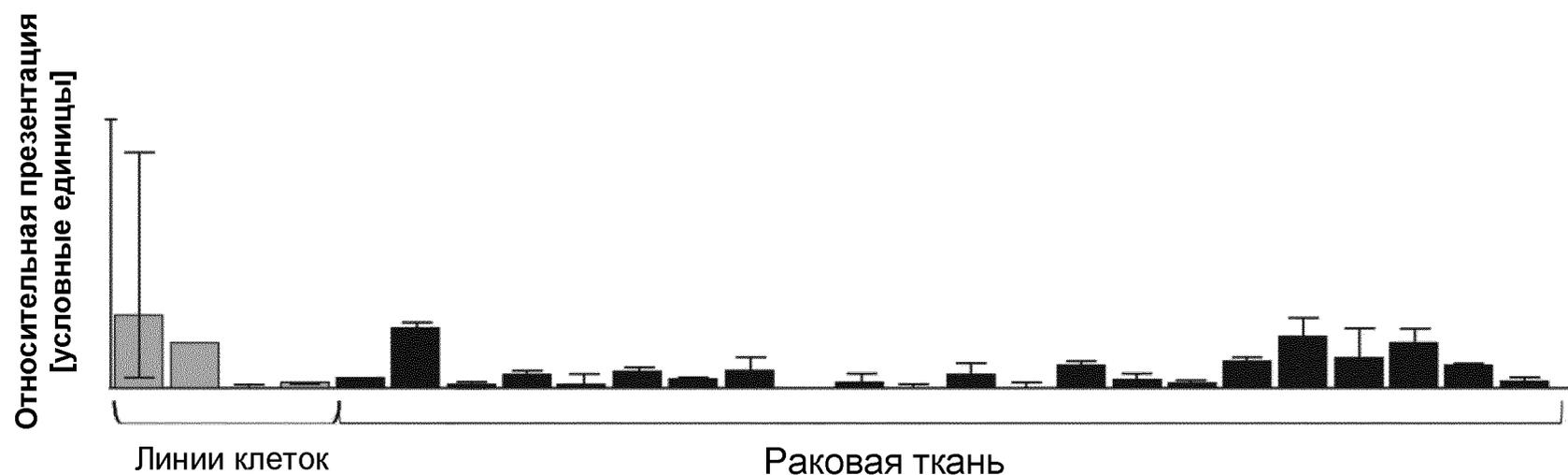


Пептид, выявленный на  
1 линия клеток (1 кожа), 1 нормальная ткань (1 толстая кишка), 13 раковых тканей (1 рак головы и шеи, 6 раков головного мозга, 1 рак толстой кишки, 1 рак печени, 2 рака кожи, 2 рака мочевого пузыря) (слева направо)

Фигура 1К

**Пептид: RLLPKVQEV (A\*02)**

**SEQ ID NO: 325**



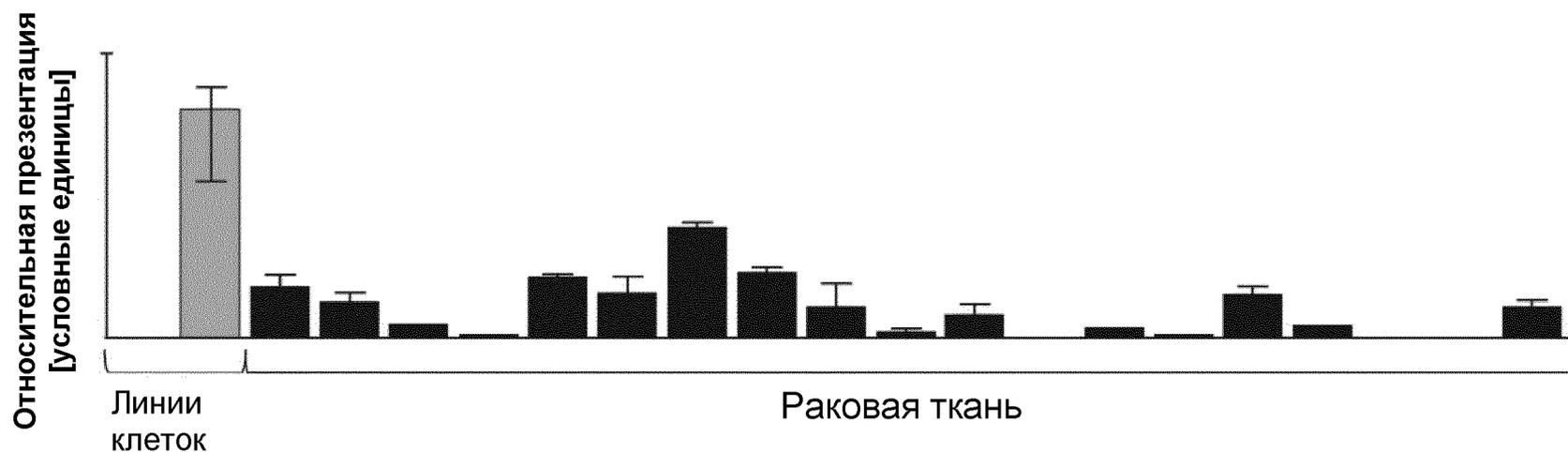
Пептид, выявленный на

4 клеточные линии (2 линии клеток крови, 1 почка, 1 толстая кишка), 22 раковые ткани (1 рак миелоидных клеток, 1 рак молочной железы, 1 рак пищевода, 4 рака толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 10 раков легких, 2 рака яичника, 1 рак желудка, 1 рак мочевого пузыря) (слева направо)

Фигура 1L

**Пептид: VLGPGRPPL (A\*02)**

**SEQ ID NO: 339**

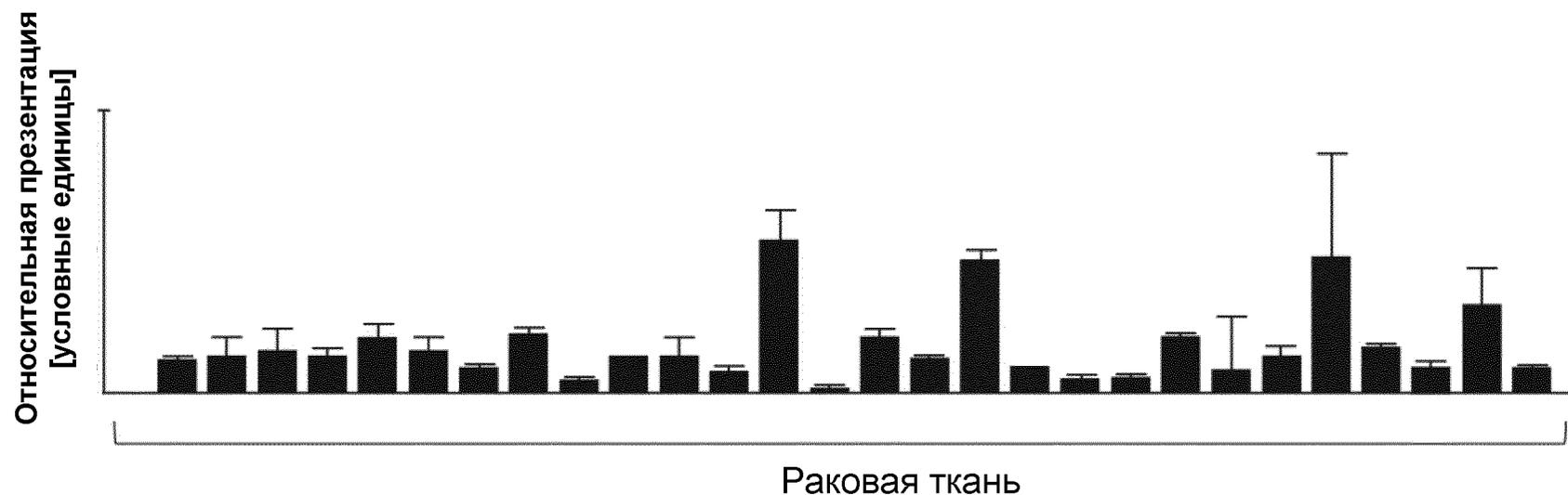


Пептид, выявленный на

4 клеточные линии (1 почка, 1 поджелудочная железа), 19 раковых тканей (4 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак костного мозга, 2 рака головного мозга, 1 рак печени, 2 рака легких, 6 раков лимфатических узлов, 1 рак кожи, 1 рак матки) (слева направо)



Фигура 1N  
Пептид: IYSFHTLSF (A\*24)  
SEQ ID NO: 113

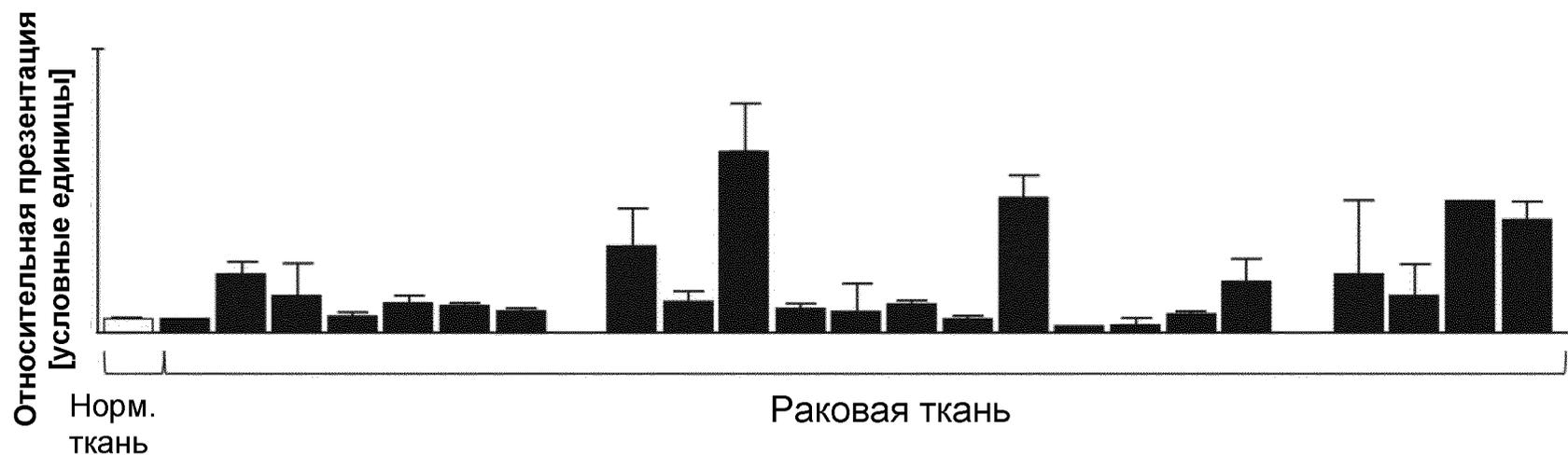


Пептид, выявленный на  
28 раковых тканях (1 рак предстательной железы, 1 рак головного мозга, 25 раков легких, 2 рака желудка) (слева направо)

Фигура 10

**Пептид: RYLNKSFVL (A\*24)**

**SEQ ID NO: 115**



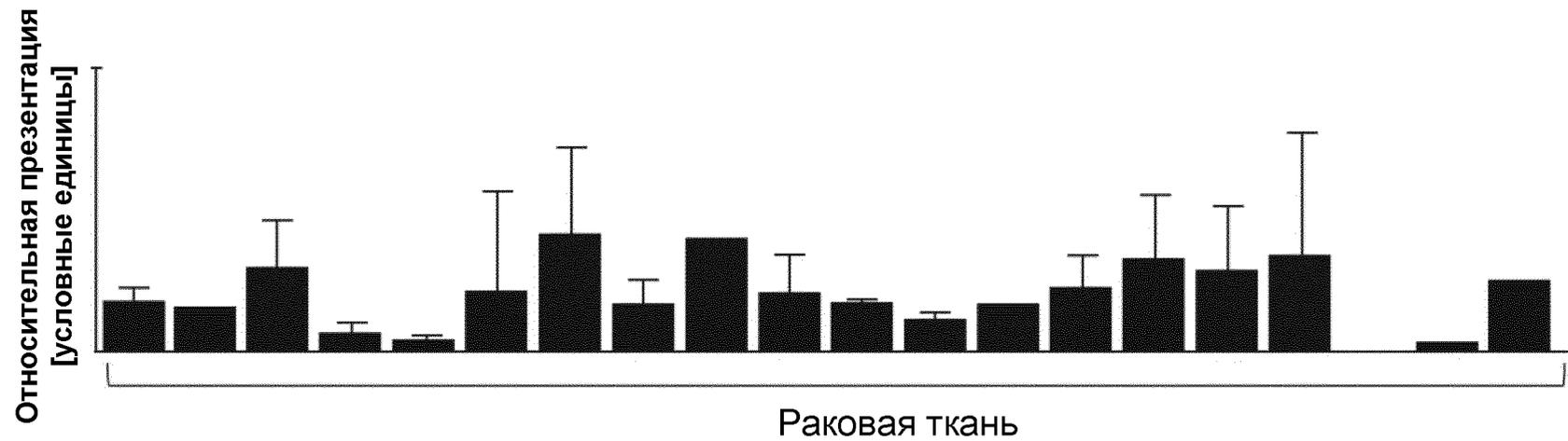
Пептид, выявленный на

1 нормальная ткань (1 желудок), 25 раковых тканей (1 рак головного мозга, 2 рака печени, 17 раков легких, 2 рака предстательной железы, 3 рака желудка) (слева направо)

Фигура 1Р

**Пептид: RYGLPAAWSTF (A\*24)**

**SEQ ID NO: 121**

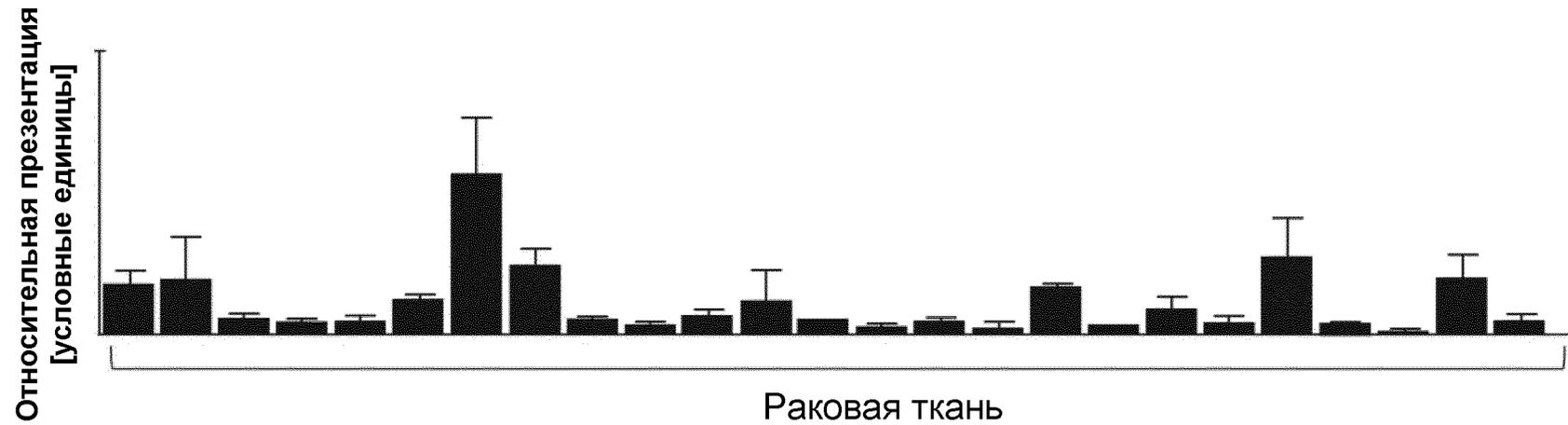


Пептид, выявленный на  
20 раковых тканях (2 рака печени, 17 раков легких, 1 рак желудка) (слева направо)

Фигура 1Q

**Пептид: VYALKVRTI (A\*24)**

**SEQ ID NO: 145**

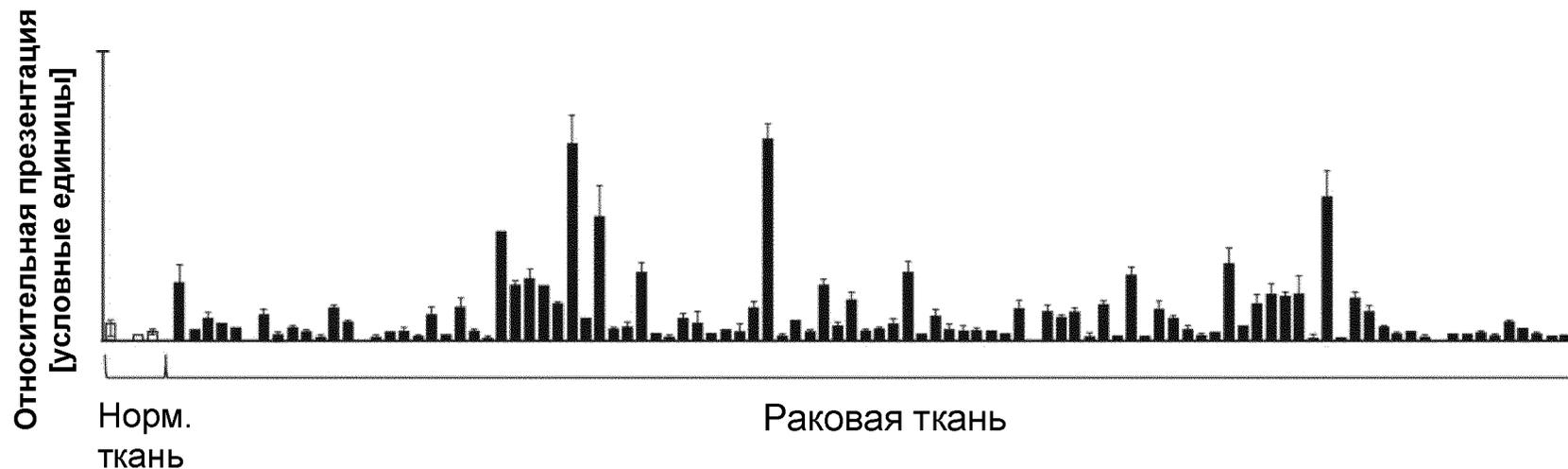


Пептид, выявленный на  
25 раковых тканей (25 раков легких) (слева направо)

Фигура 1R

Пептид: SYGTVSQIF (A\*24)

SEQ ID NO: 148



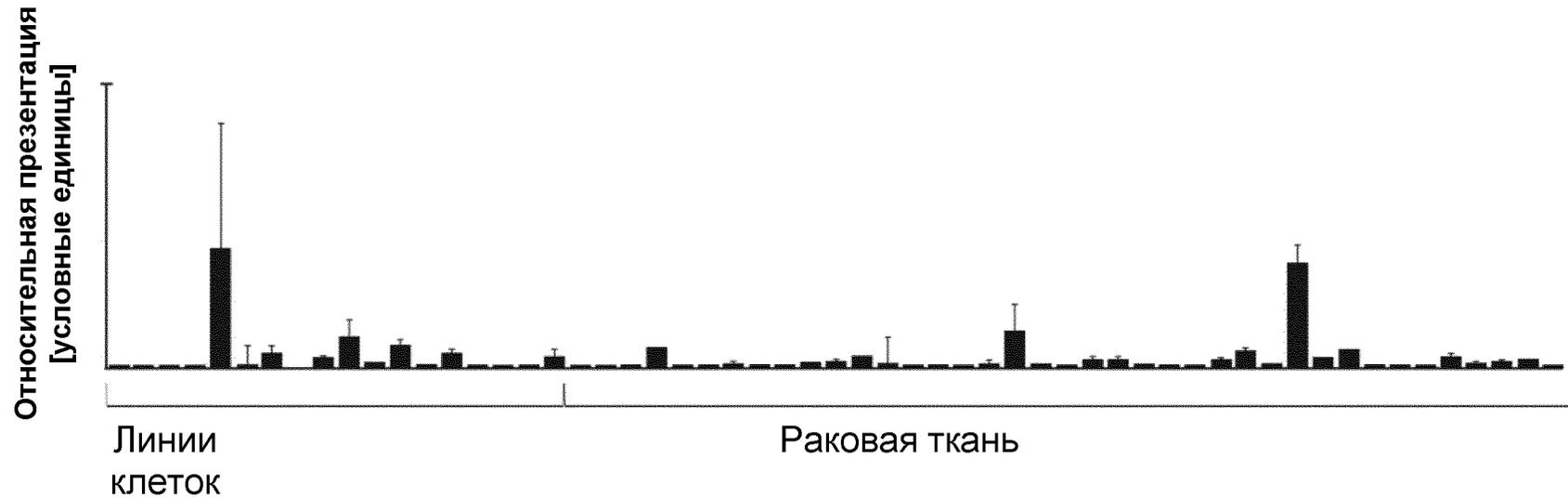
Пептид, выявленный на

5 нормальных тканей (1 печень, 3 легких, 1 гипофиз), 100 раковых тканей (10 раков головного мозга, 4 рака печени, 74 рака легких, 1 рак предстательной железы, 11 раков желудка) (слева направо)

Фигура 1S

**Пептид: IYKWITDNF (A\*24)**

**SEQ ID NO: 155**



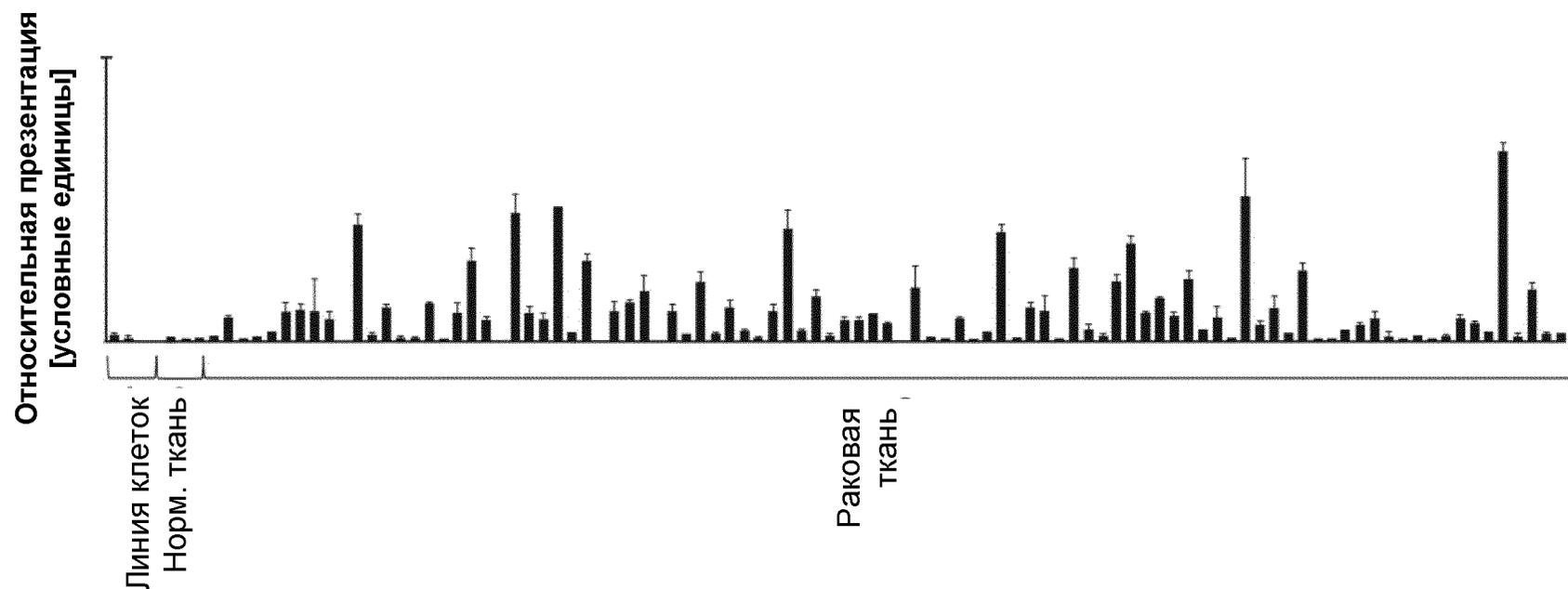
Пептид, выявленный на

4 нормальные ткани (4 почки), 53 раковых тканей (10 раков головного мозга, 1 рак печени, 26 раков легких, 1 рак предстательной железы, 15 раков желудка) (слева направо)

Фигура 1Т

**Пептид: KYTSYILAF (A\*24)**

**SEQ ID NO: 162**



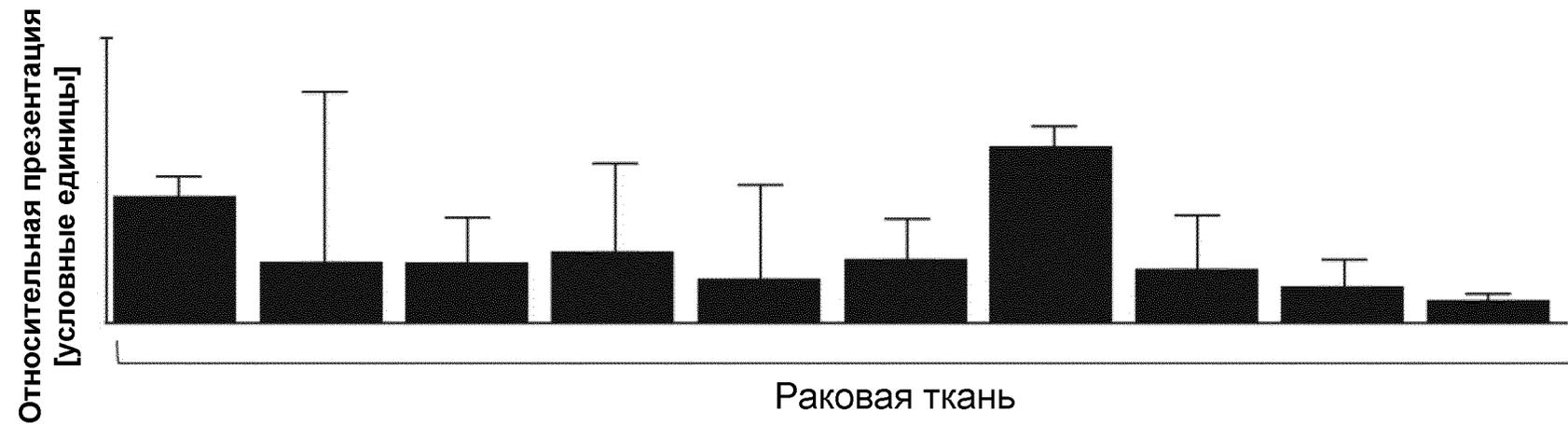
Пептид, выявленный на

3 клеточные линии (3 предстательные железы), 4 нормальные ткани (1 печень, 1 легкое, 1 поджелудочная железа, 1 желудок), 95 раковых тканей (1 рак почки, 5 раков печени, 71 рак легких, 2 рака предстательной железы, 16 раков желудка) (слева направо)

Фигура 1U

**Пептид: EYFTPLLSGQF (A\*24)**

**SEQ ID NO: 165**

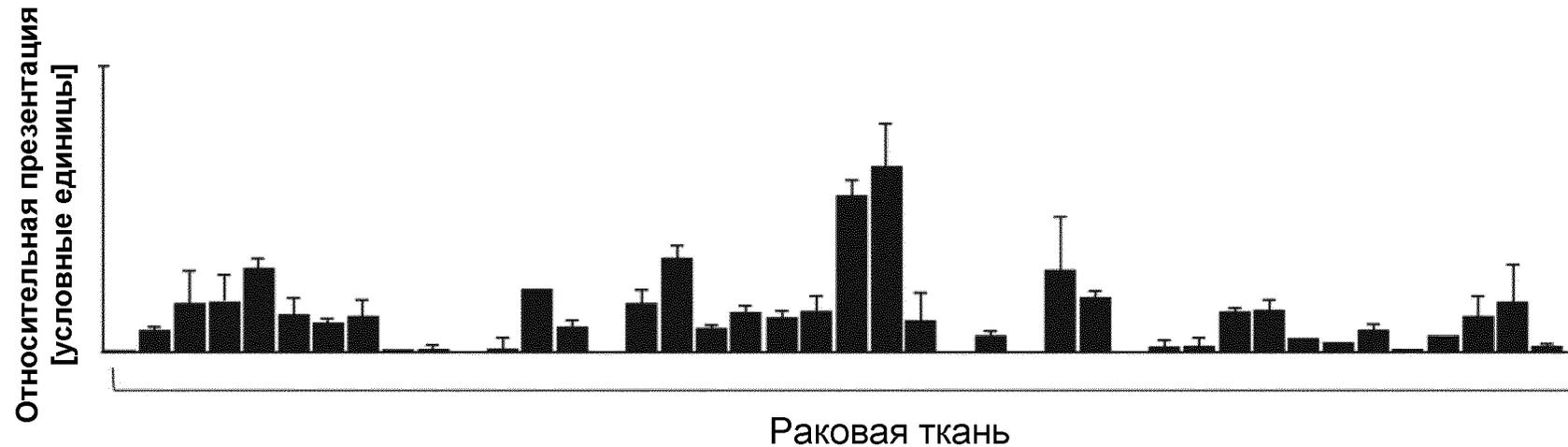


Пептид, выявленный на  
10 раковых тканях (10 раков легких) (слева направо)

Фигура 1V

Пептид: LYSPVPFTL (A\*24)

SEQ ID NO: 175



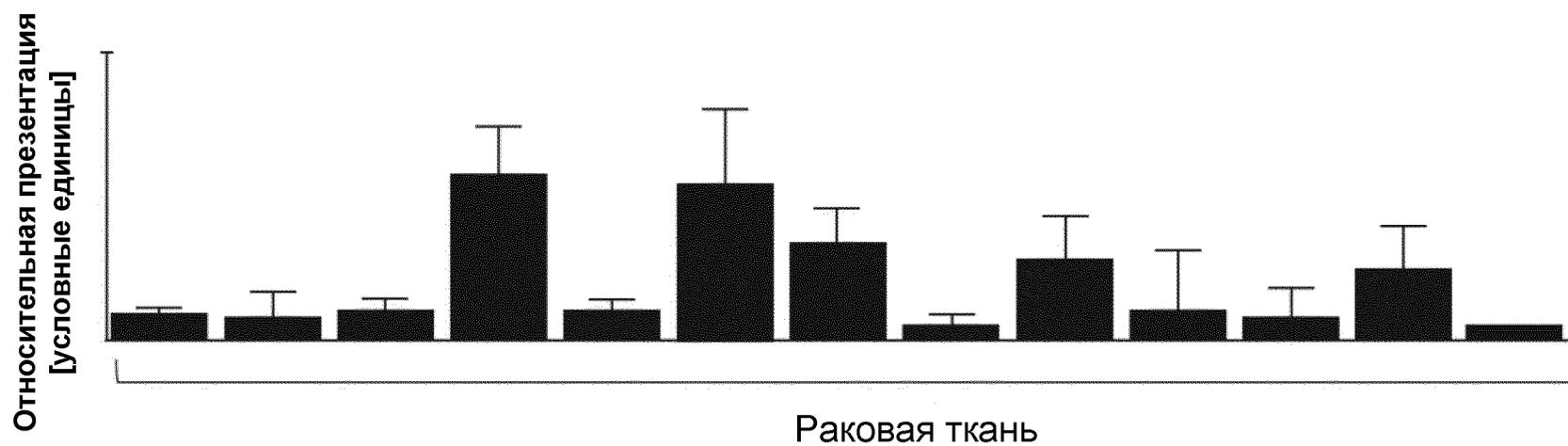
Пептид, выявленный на

42 раковые ткани (4 рака головного мозга, 1 рак печени, 30 раков легких, 7 раков желудка) (слева направо)

Фигура 1W

Пептид: EYnSDLHQFF (A\*24)

SEQ ID NO: 345



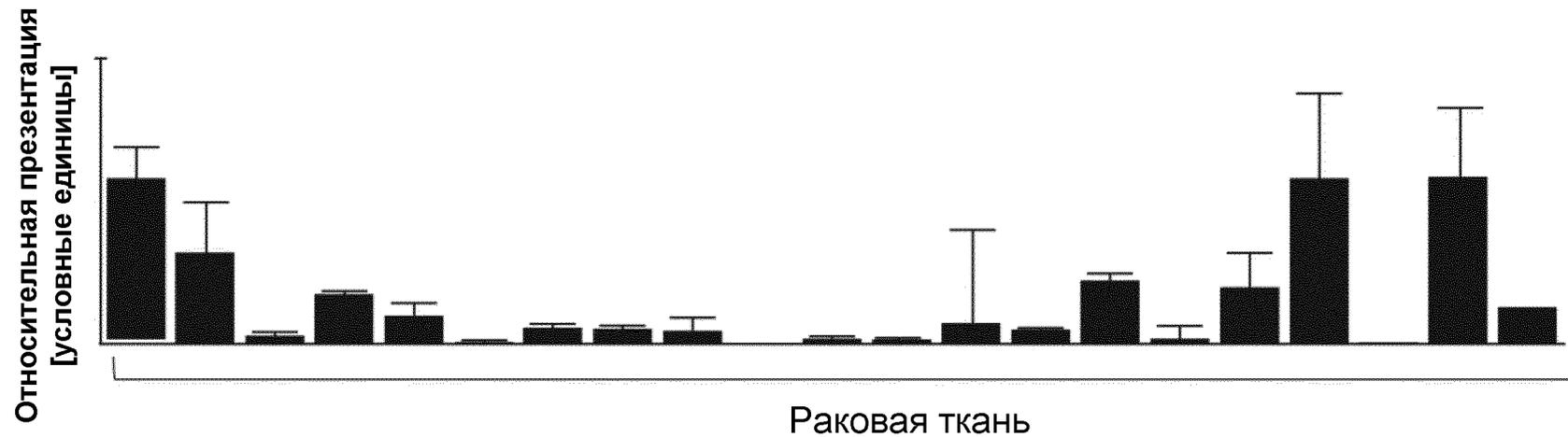
Пептид, выявленный на

13 раковых тканей (3 рака головного мозга, 10 раков легких) (слева направо)

Фигура 1X

Пептид: IYVIPQRHF (A\*24)

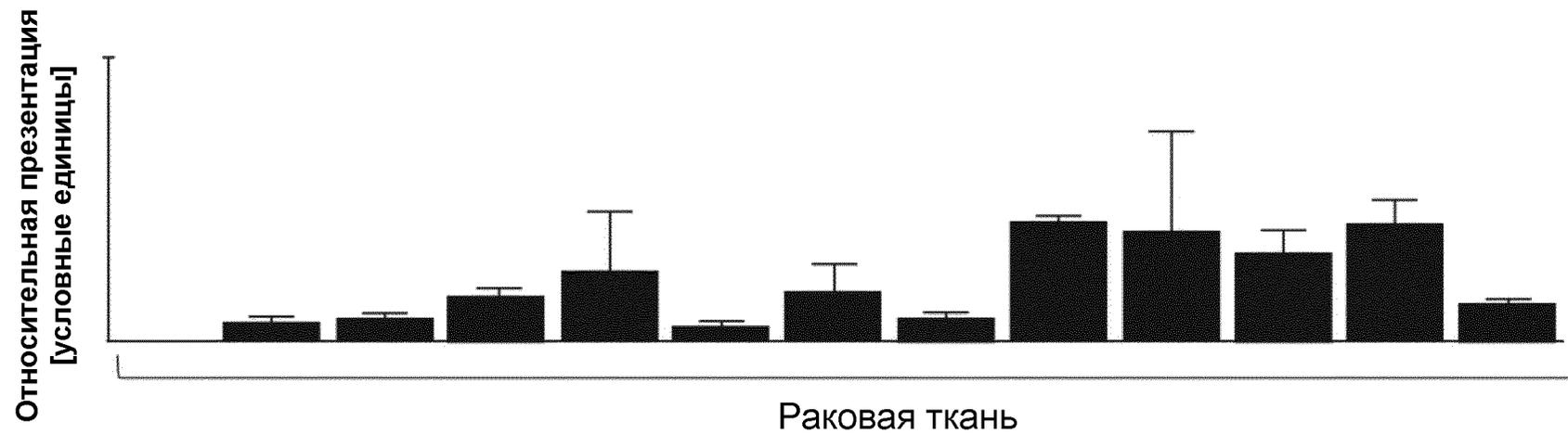
SEQ ID NO: 346



Пептид, выявленный на

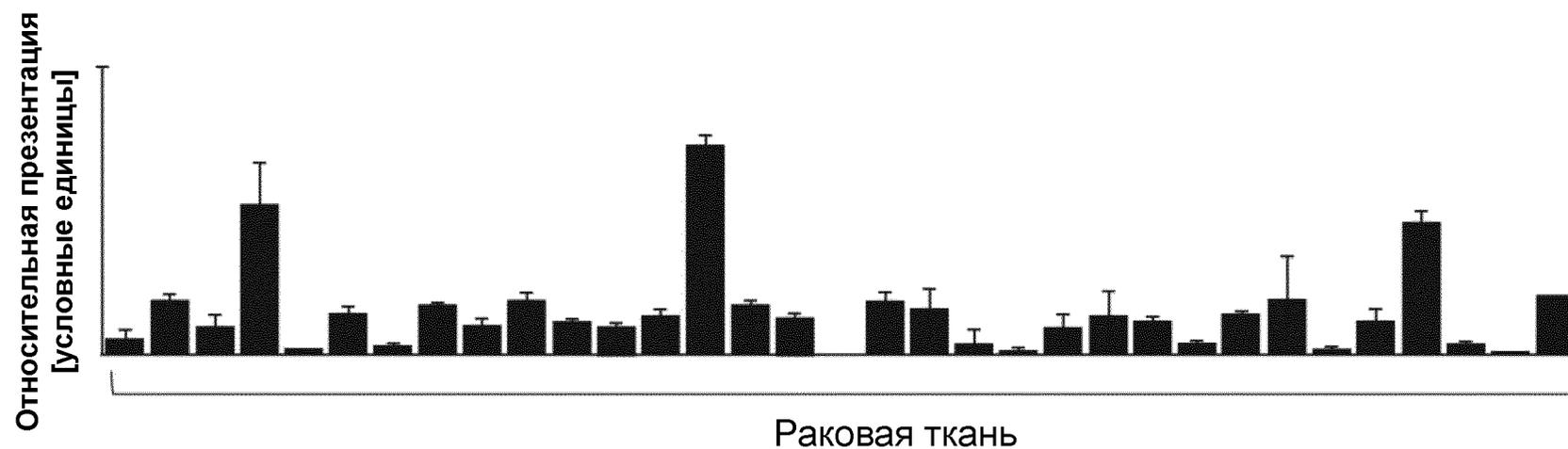
21 раковая ткань (3 рака головного мозга, 1 рак почки, 1 рак печени, 14 раков легких, 2 рака желудка) (слева направо)

Фигура 1Y  
Пептид: VYNEQIRDLL (A\*24)  
SEQ ID NO: 354



Пептид, выявленный на  
13 раковых тканях (1 рак головного мозга, 11 раков легких, 1 рак желудка) (слева направо)

Фигура 1Z  
Пептид: VFSPDGHLF (A\*24)  
SEQ ID NO: 360



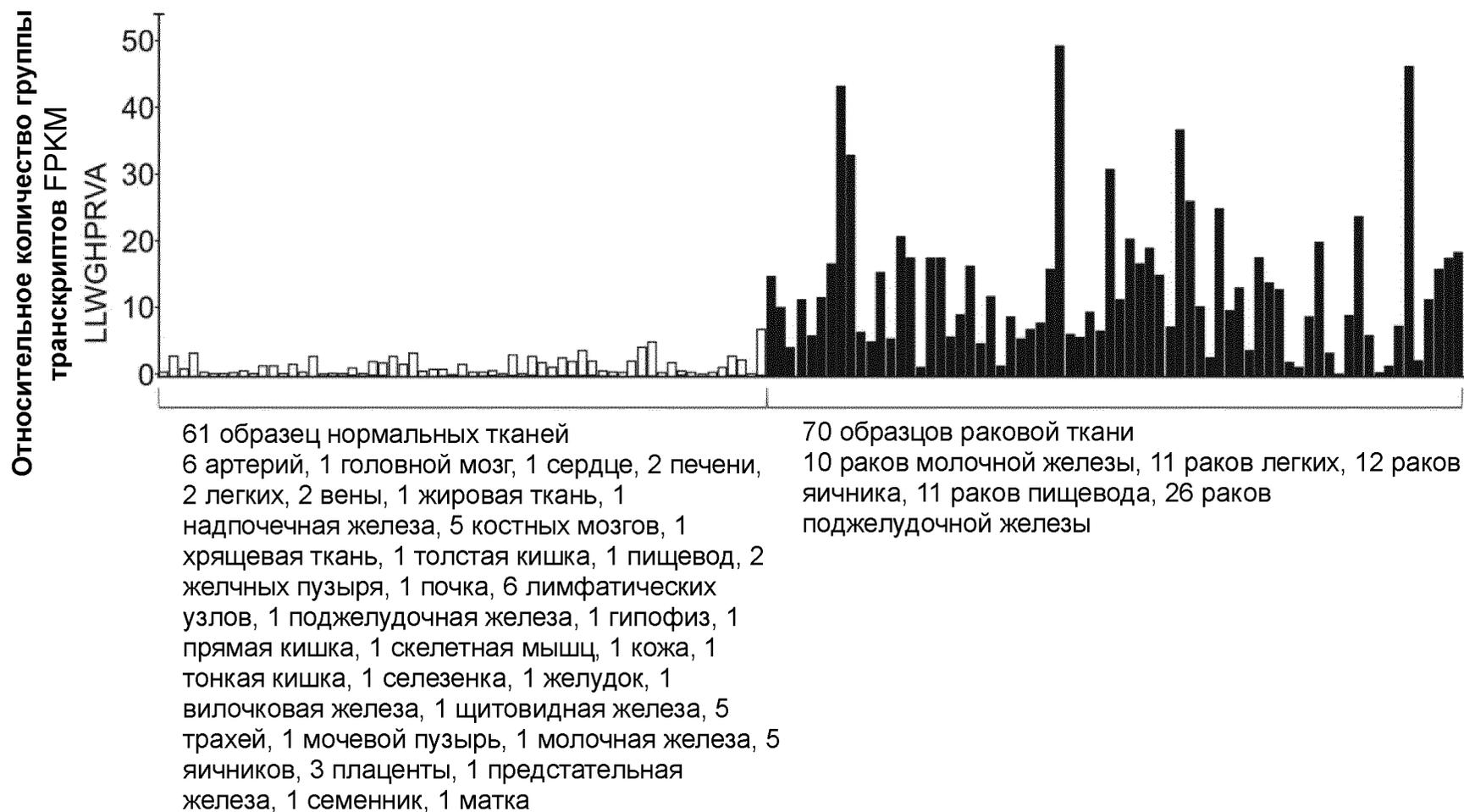
Пептид, выявленный на  
33 раковые ткани (4 рака печени, 27 раков легких, 1 рак предстательной железы, 1 рак желудка)  
(слева направо)

Фигура 2А

Ген: **MXRA5**

Пептид: **LLWGHPRVA**

SEQ ID NO: 78

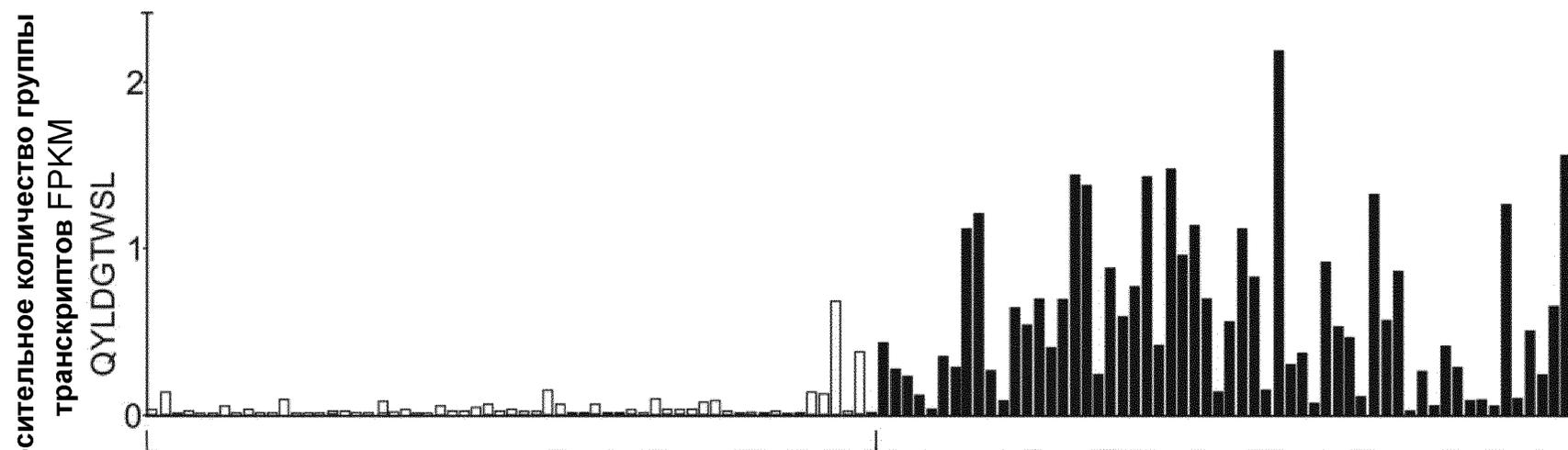


Фигура 2В

Ген: KIF26B

Пептид: QYLDGTWSL

SEQ ID NO: 114



Относительное количество группы транскриптов FPKM QYLDGTWSL

61 образец нормальных тканей

6 артерий, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 1 поджелудочная железа, 1 гипофиз, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 5 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 матка

58 образцов раковой ткани

10 раков молочной железы, 11 раков легких, 11 раков пищевода, 26 раков поджелудочной железы

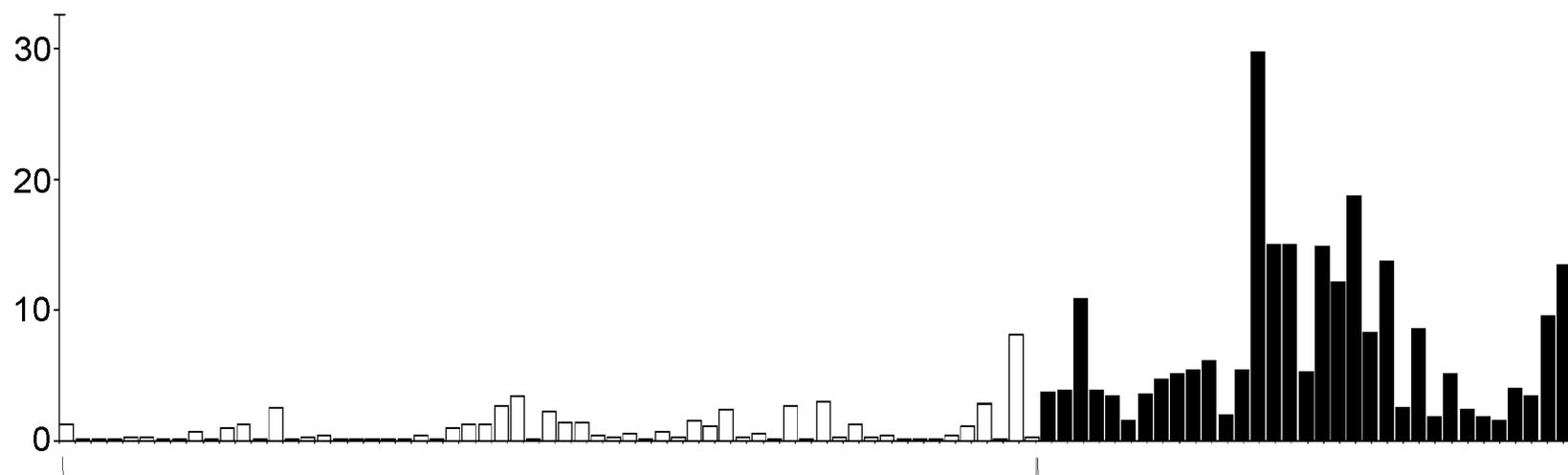
Фигура 2С

Ген: IL4I1

Пептид: NYVPATKVF

SEQ ID NO: 164

### Относительное количество группы транскриптов NYVPATKVF FPKM



61 образец нормальных тканей

6 артерий, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены,  
1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1  
хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 желчных пузыря,  
1 почка, 6 лимфатических узлов, 1 поджелудочная железа, 1  
гипофиз, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая  
кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 вилочковая железа, 1  
щитовидная железа, 5 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная  
железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1  
семенник, 1 матка

34 образца раковой ткани

11 раков легких, 12 раков яични  
11 раков пищевода

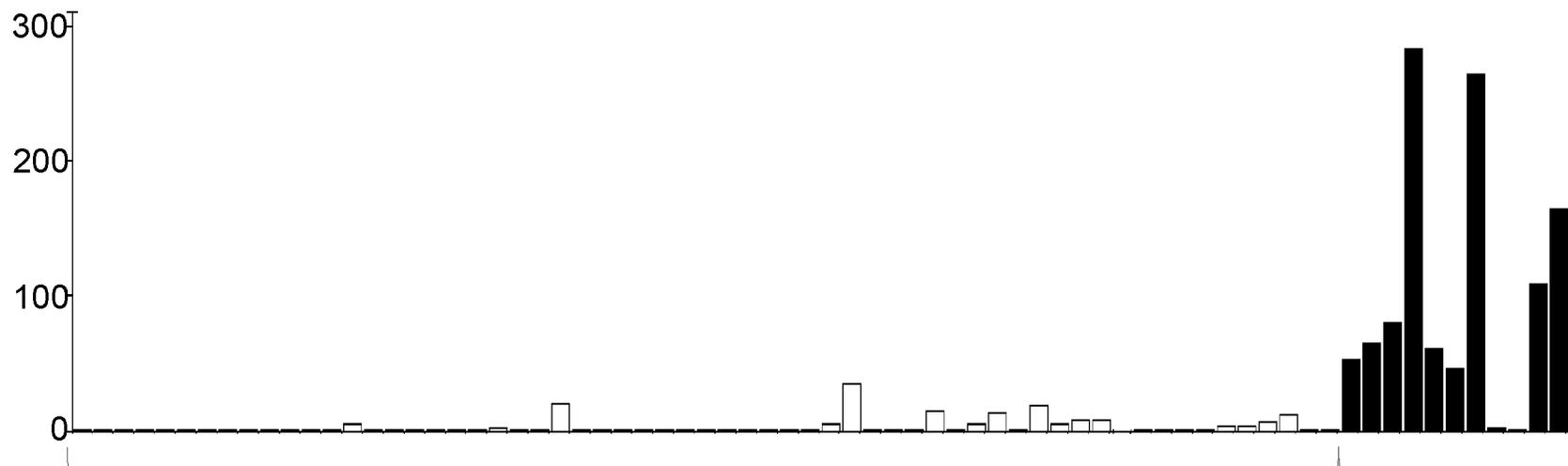
Фигура 2D

Ген: TP63

Пептид: LYLENNAQTQF

SEQ ID NO: 193

Относительное количество группы транскриптов LYLENNAQTQF FPKM

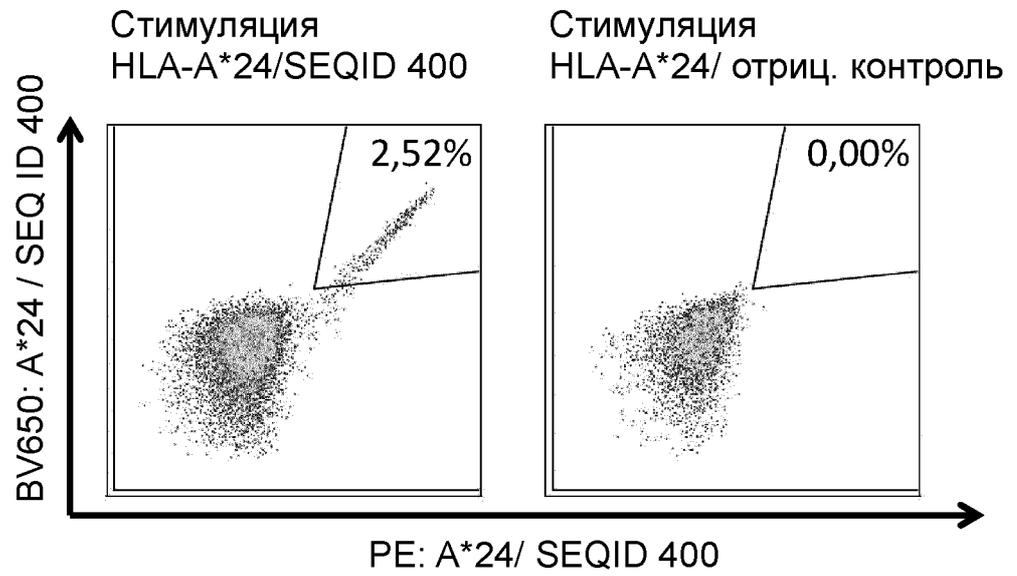


61 образец нормальных тканей

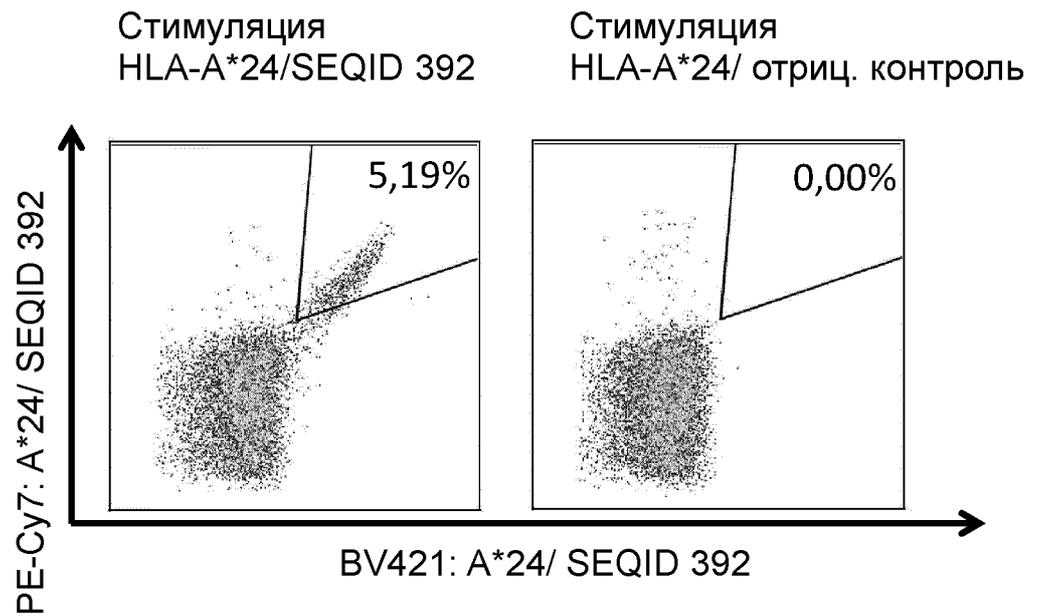
6 артерий, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозга, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 1 поджелудочная железа, 1 гипофиз, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 5 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 матка

11 образцов  
рака  
пищевода

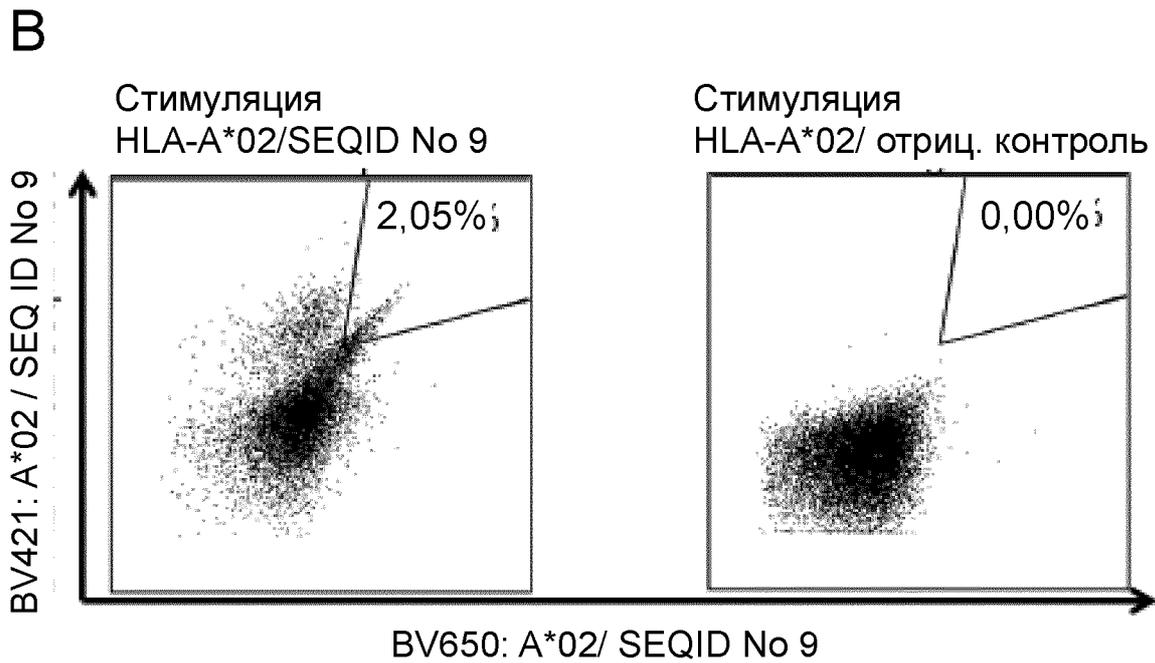
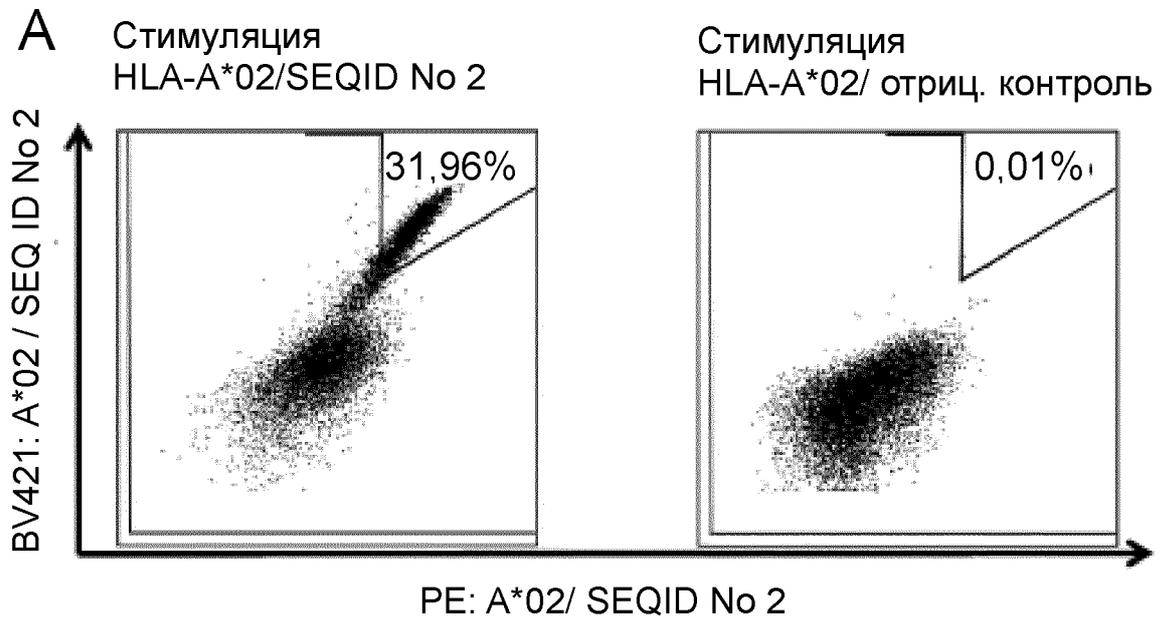
Фигура 3 А



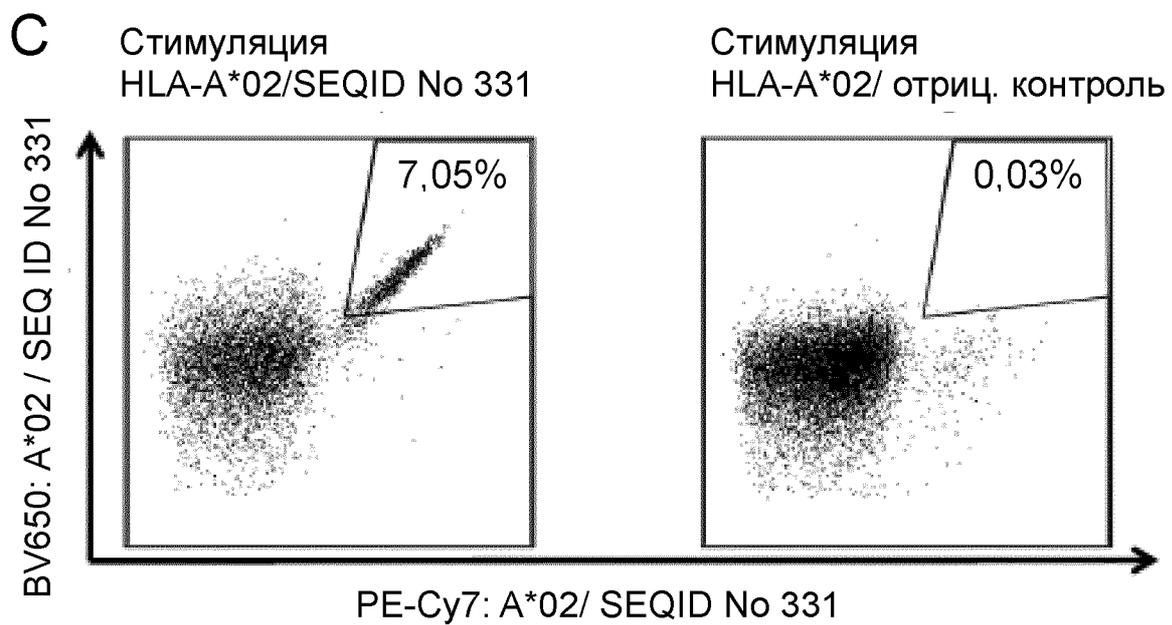
В



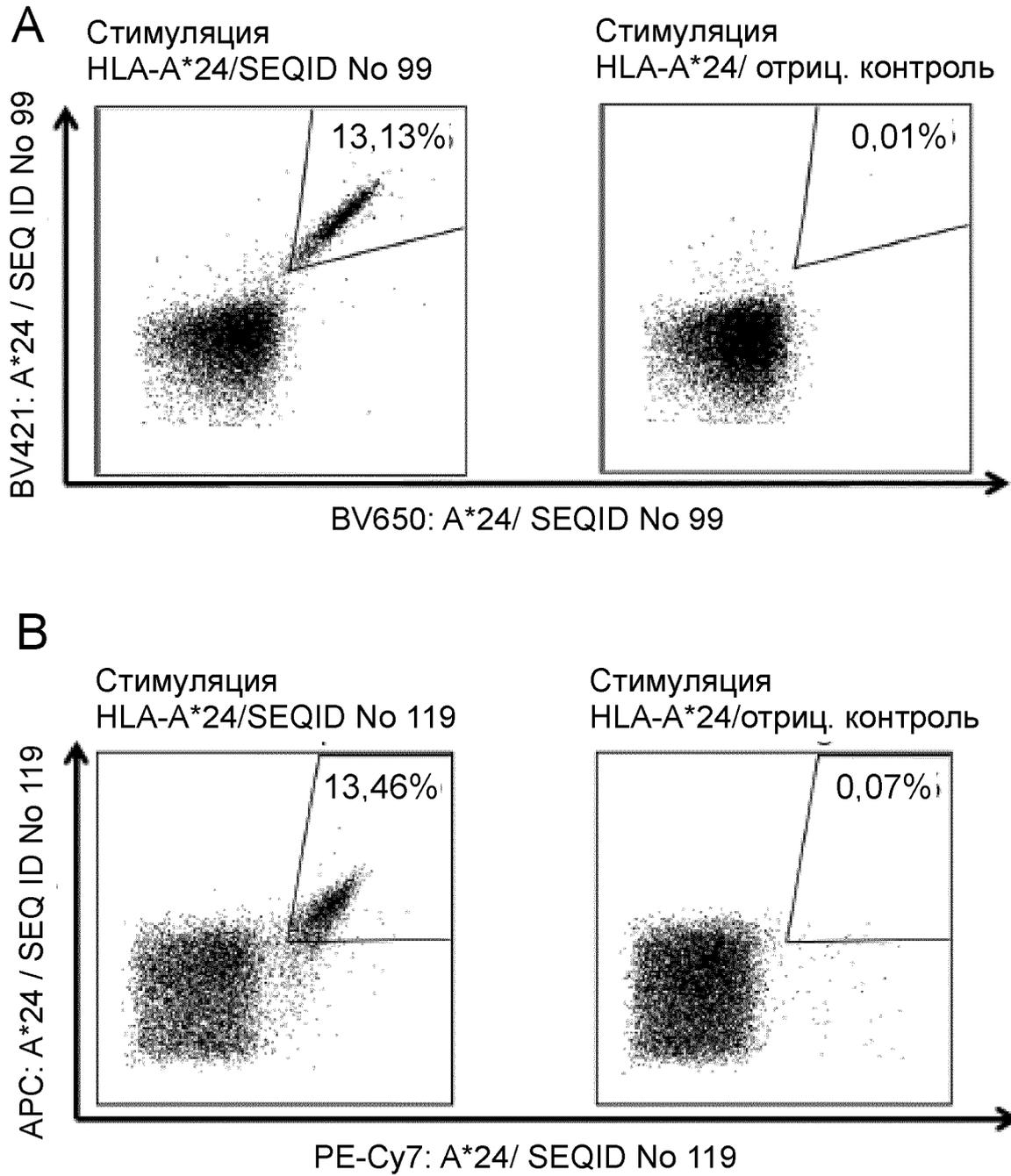
Фигура 4



Фигура 4 (продолжение)



Фигура 5



Фигура 5 (продолжение)

