

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21)

202393412

(13)

A2

(12)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43)

Дата публикации заявки
2024.02.29

(51)

Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(22)

Дата подачи заявки
2019.09.18

(54)

ИММУНОТЕРАПИЯ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЕСТРИКТИРОВАННЫМИ ПО
А*01 ПЕПТИДАМИ И КОМБИНАЦИЯМИ ПЕПТИДОВ И ОТНОСЯЩИЕСЯ К НЕЙ
СПОСОБЫ

(31)

10 2018 122 900.3; 62/732,863

(32)

2018.09.18

(33)

DE; US

(62)

202190572; 2019.09.18

(71)

Заявитель:
ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)

(72)

Изобретатель:
Шустер Хейко, Соннтаг Анника,
Ковалевский Дэниэл, Шоор Оливер,
Фритше Йенс, Вайншенк Тони, Сингх
Харпреет, Сонг Колетт (DE)

(74)

Представитель:
Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Угрюмов В.М., Джермакян Р.В. (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 опухолиассоциированным пептидным эпитопам Т-клеток, в отдельности или в комбинации с другими опухолиассоциированными 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

202393412

202393412

A2

Иммунотерапия раковых заболеваний рестриктированными по A*01 пептидами и комбинациями пептидов и относящиеся к ней способы

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.

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 (Bray et al., 2013; Ferlay et al., 2013).

Внутри групп раковых заболеваний головного мозга, лейкоза и рака легких фокус настоящего изобретения особенно направлен на глиобластому (ГБМ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких (НМРЛ и МРЛ), соответственно.

Глиобластома является наиболее распространенным злокачественным заболеванием центральной нервной системы, стандартизованный по возрасту коэффициент заболеваемости которого составляет 3,19 на 100 000 жителей Соединенных Штатов Америки. Глиобластома имеет крайне неблагоприятный прогноз, при котором годовичная выживаемость составляет 35%, а 5-летняя выживаемость ниже 5%. Мужской пол, преклонный возраст и этническая принадлежность, по-видимому, являются факторами риска для глиобластомы (Thakkar et al., 2014).

ХЛЛ является наиболее распространенным видом лейкоза в западных странах, где на его долю приходится примерно одна треть всех случаев заболевания лейкозами. Частота заболеваемости соотносима в странах Европы и США, предполагаемое количество новых случаев составляет около 16 000 в год. ХЛЛ более распространен среди европеоидного, а не африканского населения, реже встречается у людей испано-латиноамериканского происхождения и коренного населения Америки и редко у монголоидов. У лиц монголоидной расы частота заболеваемости ХЛЛ в 3 раза ниже, чем у представителей европеоидной расы (Gunawardana et al., 2008). Пятилетняя общая выживаемость для пациентов с ХЛЛ составляет около 79%.

ОМЛ является вторым наиболее распространенным видом лейкоза, диагностируемым как у взрослых, так и у детей. Приблизительное число новых

случаев в Соединенных Штатах составляет около 21 000 в год. Пятилетняя выживаемость людей, больных ОМЛ составляет приблизительно 25%.

Рак легких является наиболее распространенным видом рака в мире и основной причиной смерти от рака во многих странах. Рак легких подразделяется на мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легких. НМРЛ включает гистологические типы: аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома и крупноклеточная карцинома, и на его долю приходится 85% всех случаев заболевания раком легких в США. Возникновение НМРЛ тесно коррелирует с распространением курения, включая курящих в настоящее время и куривших в прошлом, и, как сообщалось, пятилетняя выживаемость составляет 15% (Molina et al., 2008; World Cancer Report, 2014).

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 острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и рака эндометрия в частности.

Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного

рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и рака эндометрия матки в частности, что позволит лучше ставить диагноз, составлять прогноз и предсказывать успех лечения для пациентов с аллелем A*01.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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).

Более длинные (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 TH1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих комплексы опухолеассоциированный пептид / МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

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

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

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: 398 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: 398, где указанный вариант связывается с МНС и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение относится далее к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398, 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 398, где указанный

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

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO. и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. В Таблице 1 пептиды с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 385 связываются с HLA-A*01. Пептиды из Таблицы были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скринингов с высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями. В Таблице 2 пептиды с последовательностью с SEQ ID NO: 386 по SEQ ID NO: 398 связываются с HLA-A*01. Пептиды из Таблицы являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. В Таблице 3 пептиды с последовательностями с SEQ ID NO: 399 по SEQ ID NO: 431 связываются с HLA-A*01.

Таблица 1: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением.

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
1	TLDSTRTLY	TRPM8	A*01
2	VDPIGHLY	MAGEA3	A*01
3	FGTTPAAEYF	SLC6A3	A*01
4	RIEAIRAEY	TRIM51,TRIM51EP,TRIM51GP,TRIM51HP	A*01
5	FMVIAGMPLFY	SLC6A3	A*01
6	ARDPITFSF	UMODL1	A*01
7	ASDDVRIEVLGY	UMODL1	A*01
8	TSRAANIPGY	C7orf72	A*01
9	QLDSTLDSY	CYP4Z1,CYP4Z2P	A*01
10	VSERTGISY	ITIH6	A*01
11	ASDHWGRGY	SLC45A3	A*01
12	YTDFVGEGLY	SLC45A3	A*01
13	NTHTGTRPY	CTCFL	A*01
14	QSEKEPGQQY	RHOXF2,RHOXF2B	A*01
15	YLDSSKPAVY	ESR1	A*01
16	NSDISIPEY	SCGB2A1	A*01

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
17	ASWAVLCYY	ANO7	A*01
18	RSDPVSLRY	COL20A1	A*01
19	LTEGHSGNY	FCRL5	A*01
20	LSAQHRMLA	EML6	A*01
21	LSSAVNPIIY	NMUR2	A*01
22	VMDTLGLFY	TRPM8	A*01
23	DTDPLKAAGL	SOX14	A*01
24	NLDHYTNAY	GLYATL3	A*01
25	AMMQEAQLAY	SOX1	A*01
26	ASDDFRSKY	KRT34,LOC100653049	A*01
27	PSEVPVDSHY	LOXL4	A*01
28	PSEVPVDSHY	LOXL4	A*01
29	TLEDLDNLYNY	EPYC	A*01
30	VTTDKPRAY	ITIH6	A*01
31	VSDHLQAGMLGQY	HEPHL1	A*01
32	GTDKQNSTLRY	HMCN1	A*01
33	SMDPVTGYQY	PAX3	A*01
34	SSWSAGENDSY	HRNR	A*01
35	SWSAGENDSYS	HRNR	A*01
36	MTSTEQSLY	GREB1	A*01
37	MTSTEQSLYY	GREB1	A*01
38	KSWSSQSSSLMY	F5	A*01
39	WSQSSSLMY	F5	A*01
40	TSDQLGYSY	DCT	A*01
41	HSDLLEDSKY	NAT1	A*01
42	ASDVDTLK	PTPRZ1	A*01
43	ETEPERHLGSY	NKX3-1	A*01
44	IPSFNEMVY	PTPRZ1	A*01
45	NLDPNKIY	STK31	A*01
46	RSDPGGGGLAYAY	MEX3B	A*01
47	WSDGVPLLY	BCAN	A*01
48	FTTQDELLVY	SEMG2	A*01
49	GSFSIQHTY	SEMG2	A*01
50	ITDEDEDMLSY	TSPY1,TSPY10,TSPY2,TSPY3,TSPY4,TSPY8,TSPY9P	A*01
51	STEERRLNY	SEMG2	A*01
52	TTQDELLVY	SEMG2	A*01

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
53	YLEDRPLSQLY	LOXL4	A*01
54	EVDIHTIHY	HEPHL1	A*01
55	ATEGDVLNY	COL19A1	A*01
56	VTEYAEEIYQY	CCNA1	A*01
57	ASDPASSTSCY	CYP1A1	A*01
58	YLENSASWY	DLX5	A*01
59	FTDSQGNDIK	SLC45A2	A*01
60	MTEKFLFLY	ERVV-1,ERVV-2	A*01
61	SSDIVALGGFLY	KLHDC7B	A*01
62	VSELVTTGHY	VCAN	A*01
63	TSEISQNALMY	ROS1	A*01
64	TSEISQNALMY	ROS1	A*01
65	SSDFDPLVY	RNF43,SUPT4H1	A*01
66	IATVIQLFY	HAS2,HAS3	A*01
67	NVDQNNQNSY	HMCN1	A*01
68	QSLPEFGLTY	FERMT1	A*01
69	QSLPEFGLTY	FERMT1	A*01
70	YTELVEEKY	CAPN6	A*01
71	LTDSTTRTTY	MUC3A	A*01
72	VTDSTTKIAY	LOC101060740	A*01
73	STDSASY	APOB	A*01
74	EMEQQSQEY	KRT13,KRT16	A*01
75	FTDYELKAY	ABCB11	A*01
76	QTDVERIKDTY	LAMA3	A*01
77	FTSDTGLEY	DNMT3B	A*01
78	QLDSAVKNLY	ZNF215	A*01
79	ASDLEPRELLSY	PCDHGB1	A*01
80	ELCPLPGTSAY	FBN3	A*01
81	YSDLHTPGRY	PTCHD4	A*01
82	LTEKSHIRY	C8orf48	A*01
83	DTEFHGGLHY	LOC100124692	A*01
84	ESEMIKFASY	ABCB11	A*01
85	SSDNYEHWLY	SFMBT1	A*01
86	VDPASNTY	MAGEA4	A*01
87	AFDDIATYF	SSX1	A*01/ C*04
88	KEVDPAGHSYI	MAGEA8,MAGEA9,MAGEA9B	A*01/ B*49
89	EVYDGREHSAY	MAGEA1	A*01/ A*25
90	YEDHFPLLF	MAGEA10	A*01/ B*18
91	CLVLVIVLLY	SLC6A3	A*01

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
92	TTDDTTAMASAS	MAGEA10	A*01
93	HLKILSPIY	UMODL1	A*01
94	KPSAVKDSIY	MMP26	A*01/ A*26
95	SSDPKAVMF	MMP12	A*01/ C*05
96	TATLLIVRY	UMODL1	A*01
97	FPAPPAHWFY	CYP4Z1,CYP4Z2P	A*01
98	NFSDLVFTY	SOX11	A*01/ A*29
99	AADSNPSEL	RLN1	A*01/ C*05
100	TTSSAISWILY	CYP4Z1	A*01
101	SITDVDFIY	DNAH8	A*01
102	STIRGELFF	MMP11	A*01/ B*57
103	ITDTLIHLM	ESR1	A*01/ C*05
104	ITDTLIHL	ESR1	A*01/ C*05
105	VVFDKSDLAKY	SLC45A3	A*01/ A*29
106	EVVEGKEWGSFY	NPSR1	A*01/ A*26
107	TTENSGNYY	FCRL5	A*01
108	NSNLKFLEV	NLRP7	A*01
109	ISEDKSISF	LOC100996718,OR9G1,OR9G9	A*01/ B*15
110	IGDKVDAVY	MMP13	A*01
111	TPIPFDKILY	COL10A1	A*01/ B*35
112	KASSVSAEDGY	TTC6	A*01/ B*57
113	ASCRSSAEY	LAMC2	A*01
114	AVAAAAGASLY	MSX1	A*01
115	NEIDIHSIYFY	HEPHL1	A*01/ B*18
116	RSDIGEFEW	FAM111B	A*01/ B*58
117	SPAKQFNIY	FAM111B	A*01/ B*35
118	LTWAHSAKY	LOXL4	A*01
119	TVFDENLSRY	HEPHL1	A*01/ C*12
120	LVDENQSWY	HEPHL1	A*01
121	SADEAHGLL	NFE2L3	A*01/ C*05
122	ISEAPLTEV	SLC45A2	A*01/ C*08
123	LLKAKDILY	ACSM1	A*01
124	FLKVTGYDKDDY	HMCN1	A*01
125	FQYELRELY	HMCN1	A*01/ B*15
126	TTDPKKFQY	HMCN1	A*01
127	VPFNLITEY	SLC45A2	A*01/ B*35
128	YTEFVDATFTK	HEPHL1	A*01
129	STIDFRAGF	HMCN1	A*01/ B*57
130	YIGLKGLYF	SLC45A2	A*01/ A*23

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
131	LEDGIEQSAY	G2E3	A*01
132	RTHIGYKVY	HMCN1	A*01
133	ITDVGPGRNY	LOXL4	A*01
134	SAPSSSGSPLY	T	A*01
135	TFDKQIVLL	F5	A*01/ C*04
136	RRLNFSGFGY	ASCL1	A*01/ B*27
137	EAYLERIGY	NAT1,NAT2	A*01/ B*15
138	IPVHDSVGVTY	PTPRZ1	A*01/ B*35
139	PVHDSVGVTY	PTPRZ1	A*01
140	SQHIFTVSY	PTPRZ1	A*01/ B*15
141	DAVAPGREY	F5	A*01/ B*35
142	IEKFAVLY	PTPRZ1	A*01/ B*18
143	HVSGQMLYF	PGR	A*01/ A*29
144	RTIEGDFLW	BCAN	A*01/ A*32
145	LSDAVHVEF	FCRL3	A*01/ C*05
146	LCATVCGTEQY	MMP16	A*01
147	AQVQDTGRY	HMCN1	A*01
148	GTKQWWHARY	FCER2	A*01/ A*30
149	PIMSSSQALY	HMCN1	A*01
150	FTTSLDLQTNMA	MEIOB	A*01
151	YEVDTKLLSL	MEIOB	A*01
152	YLEDRLPSQ	LOXL4	A*01
153	HSIEVFTHY	LOXL4	A*01
154	SIEVFTHY	LOXL4	A*01
155	HTMEVTVY	PMEL	A*01/ B*15
156	STALSILL	BCAN	A*01
157	GLIEVVTGY	IGF1R	A*01/ B*15
158	EVTDRNMLAF	TRPS1	A*01/ A*25
159	RQAPGPARDY	KRT13,KRT17	A*01/ B*15
160	EVLGEEMYAY	LOC101060117,TTC6	A*01
161	EAAPDIMHY	GREB1	A*01/ B*35
162	IADNPQLSFY	ABCC11	A*01
163	KIRAEVLSHY	RALGPS2	A*01/ A*30
164	KLAGTVFQY	ADAMTS12	A*01
165	VSVYNSYPY	NKX3-1	A*01
166	YHRICELLSDY	POTEE,POTEF	A*01
167	RAVQPGETY	F5	A*01/ B*15
168	VQPGETYTY	F5	A*01/ B*35
169	TVDNANILL	JUP,KRT13,KRT17	A*01/ C*05

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
170	VQIAKGMNY	EGFR	A*01/ B*15
171	ITDFGLAKL	EGFR	A*01/ C*05
172	FSEPFHLIV	FCRLA	A*01/ C*12
173	QSTTGVSHY	VCAN	A*01
174	TSEVEGLAFVSY	VCAN	A*01
175	GLEYEAPKLY	DNMT3B	A*01
176	HTDLESPSAVY	BTBD16	A*01
177	LVDGKWQEF	BTBD16	A*01
178	TQRTSFQFY	ROS1	A*01/ B*15
179	SSTDFTFASW	FERMT1	A*01/ A*25
180	AQISDTGRY	HMCN1	A*01
181	SVTDLIGGKW	HTR7,HTR7P1	A*01/ B*57
182	TQPELSSRY	ADAMTS12	A*01/ B*15
183	LADTDLGMTF	OR51B4	A*01/ C*12
184	KTIQEVAGY	EGFR	A*01/ B*57
185	NSDESADSEPHK Y	PRDM15	A*01
186	AVSSGLFFY	CTLA4	A*01/ A*29
187	TQKSVQVLAY	PTPRZ1	A*01/ B*15
188	DIPDYLLQY	ELL3	A*01/ A*26
189	FRGVFVHRY	STAG3	A*01/ C*07
190	VSSTVHNLY	GREB1	A*01/ B*57
191	FTRAFDQLRM	TKTL2	A*01/ A*26
192	LAFYYGMY	SLC7A11	A*01/ B*15
193	SQNGQLIHY	SLC5A4	A*01
194	CYTADNEMGY	ROS1	A*01
195	YTADNEMGY	ROS1	A*01
196	RLAQYTIERY	GABRP	A*01/ B*15
197	NDEIDKLTGY	PDE11A	A*01
198	KLTDYINANY	PTPRZ1	A*01/ B*15
199	LCAAVLAKY	UGT1A3,UGT1A5	A*01
200	SLPEFGLTY	FERMT1	A*01/ B*15
201	SLPEFGLTY	FERMT1	A*01/ B*46
202	QTDINGGSLK	GPR143	A*01
203	LSQDELSKF	NLRP2,PYDC2	A*01
204	NVKEAPTEY	BTLA	A*01/ C*12
205	RMQEGSEVY	BTLA	A*01/ B*15
206	RVFVAVTLY	ABCC4	A*01/ B*15
207	LLEGEDAHLTQY	JUP,KRT13,KRT17	A*01
208	LLISKAEDY	IGF1R	A*01/ B*35

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
209	EADPFLKYL	CCNA1	A*01/ B*35
210	LLEADPFLKY	CCNA1	A*01
211	YLNEWGSRF	CDH3	A*01
212	MMTDLTSVY	LOC101060622,MUC3A	A*01/ A*29
213	VSDSTTEITY	MUC3A	A*01
214	VQDPSLPVY	SOX30	A*01
215	DTLEAATSLY	PLEKHG4B	A*01
216	NSMLDPLVY	HCAR1	A*01
217	LMDEGAVLTL	L1TD1	A*01/ C*17
218	FTAQLQLY	ROS1	A*01
219	KTELETALYY	GOLGA6L2	A*01
220	DVERIKDTY	LAMA3	A*01
221	TDVERIKDTY	LAMA3	A*01
222	GSPDAVVS	MAGEB6	A*01/ B*35
223	NAVDVVPSSF	NLRP2	A*01
224	RTDEGDNRVW	LY6K	A*01/ B*57
225	STDPNIVRK	TAF7L	A*01/ A*11
226	QITPKHNGLY	PSG11	A*01/ B*15
227	ESAPKEVSR	PDE10A	A*01/ A*26
228	KSFDDIAKY	SSX7	A*01/ B*15
229	MTDVFIDY	ABCB11	A*01
230	CVIETFHKY	TCHHL1	A*01
231	LLPLLVMAY	CXCR3	A*01
232	RYLNIVHATQLY	CXCR3	A*01
233	RINSATGQY	CLNK	A*01/ A*30
234	YTDLTTIQV	LRRC15	A*01
235	SIEIDHTQY	MYH4	A*01
236	VLDSLLAQY	IGF2BP1	A*01
237	AQEAAVFLTY	DNAH8	A*01
238	ETDWGLLKGHY	CAPN6	A*01
239	SSERGSPIEKY	TRPS1	A*01
240	EVLDSELLAQY	IGF2BP1	A*01/ A*25
241	SLMVASLTY	TNFSF4	A*01/ B*15
242	GTNLPTLLW	CDKAL1	A*01/ B*57
243	LTSEDGTAY	CDKAL1	A*01
244	VTKYIAGPY	PSG4,PSG5,PSG6,PSG7,PSG9	A*01
245	LSDNAANRY	MED12L	A*01
246	ARLEGEIATY	KRT36	A*01

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
247	SMIRVGTTY	RCOR2	A*01/ B*15
248	VTIDDELGK	CDK6	A*01
249	GVGFTELEY	C9orf57	A*01
250	GYVCNACGLY	TRPS1	A*01
251	GIEMTYETY	SYCP2	A*01
252	DTTSHTYLQY	ADCY8	A*01/ A*25
253	YLESHGLAY	CPA5	A*01
254	FLFNDALLY	FGD6	A*01/ A*29
255	WELDSLEY	KIF26B	A*01
256	HAFESNNFIY	MET	A*01/ B*35
257	KSEMNVNMKY	MET	A*01
258	RPSSVLTIIY	SLC44A5	A*01/ B*15
259	APDEVVALL	KLHL35	A*01
260	KPTEDSANVY	DCC	A*01
261	MTEGSTVNTEY	TEX15	A*01
262	NVKHFLNDLY	TEX15	A*01
263	DCMDTEGSYM	FBN3	A*01
264	YRDPVVFVSL	CYP2W1	A*01/ B*39
265	LSDIDSRYY	PRAMEF20,PRAMEF21	A*01
266	LTDSFLLRF	TTPA	A*01/ B*57
267	IVADDTVY	ADAM7	A*01
268	AILHHLYFY	ABCC4	A*01/ A*29
269	LPSPAATIWDY	MACC1	A*01/ B*35
270	DLKIDLAAQY	DNAH17	A*01/ A*25
271	VAEPPVVCSY	LOC730110,ZNF492,ZNF98	A*01
272	IPQDECLRY	PRAMEF1,PRAMEF13,PRAMEF14,PRAMEF2	A*01
273	CGPNEINHXY	OR5M8	A*01
274	YADIHGDLL	PARD6B	A*01/ C*05
275	ESDEMENLLTY	SERHL,SERHL2	A*01
276	QITSFASGTSY	MED12L	A*01
277	LPAPGFLFY	GDPGP1	A*01/ B*35
278	AATVKSDIY	TEX14	A*01
279	LMTVLLKY	SLC16A14	A*01
280	TTEMVSNESVDY	MET	A*01
281	YPDLSELLM	NUP155	A*01/ B*35
282	QAMPSWPTAAY	NRG3	A*01

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
283	ETILVSSSY	SLC10A5	A*01
284	TCSHTFVYY	VWDE	A*01
285	VLP HHSEGACVY	FRAS1	A*01/ B*15
286	ATDMEGNLNY	CDH4	A*01
287	ENSIEDLQY	CCDC83	A*01
288	TEEKFVSY	TSPEAR	A*01
289	YTSHEDIGY	SLC16A14	A*01
290	GQFTGTAGACRY	WT1	A*01/ B*15
291	TSDVTGSLTY	GPR31	A*01
292	VLDFAPPGASAY	WT1	A*01
293	IISVLIAY	SLC6A5	A*01
294	MMEMEGMY	DNAH8	A*01
295	GQRLDEAMISY	MYO3B	A*01/ B*15
296	HMLAAMAY	OR8G1,OR8G2,OR8G5	A*01
297	RLDEAMISY	MYO3B	A*01
298	KFDVINHYF	OR8G5	A*01
299	EVDSVALSL	VRTN	A*01
300	VSINPNSGDIY	PCDH19	A*01
301	ESQTCASDY	DCBLD1	A*01
302	FYLSTPENYHY	MYO10	A*01/ A*29
303	GFGGLSSQGVYY	NKX6-3	A*01
304	FSENLITYI	MYO1H	A*01
305	YADLLITYY	MYO3B	A*01
306	KSFETTVRY	FMN1	A*01/ C*12
307	DTDDRELRY	FREM2	A*01
308	ELAAGQVVY	FREM2	A*01/ B*18
309	EVDRNLIQY	FREM2	A*01
310	KAFQELGVRY	FREM2	A*01/ B*57
311	TVTDGTHTDFY	FREM2,FREM3	A*01
312	VTDGINPLI	FREM2	A*01
313	VTDGTHTDFY	FREM2,FREM3	A*01
314	PPEANSLQGALY	DBX2	A*01
315	VLKIELETY	CCDC6	A*01/ B*15
316	YTCEE CGQAF	ZNF479,ZNF679,ZNF727,ZNF733P,ZNF734P	A*01
317	EDLLEVLDMY	KCNH7	A*01/ B*18
318	YMTSMALNY	ITGAE	A*01
319	FTDPHIITF	VWDE	A*01/ C*04
320	QALQDKLQTFY	VWDE	A*01

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
321	DGIADASNLSYY	LOC100124692,LOC93432	A*01
322	FSELNPLALY	TDRD5	A*01
323	KTLQKPVLPY	DNMBP	A*01/ A*30
324	RTGIFPYRF	DNMBP	A*01/ B*57
325	LQKPVLPY	DNMBP	A*01/ B*15
326	STSRLTLFS	DMXL1	A*01
327	IMLSVDQHLY	RAPGEF5	A*01
328	LLDEDNNIKL	HUNK	A*01
329	NTDSMTLNNTAY	EFCAB5	A*01
330	EGELSEGEHWY	ZNF827	A*01
331	YLYQAPGSLALY	IRX2	A*01
332	SLISFKYTSY	FRAS1	A*01
333	LSDPQAELQFY	PCDHGB6	A*01
334	PSSMPECLSY	SOX30	A*01
335	PSSMPECLSY	SOX30	A*01
336	ATNIQLNIDTY	CCDC175	A*01
337	FTESNQYNIY	FSTL4	A*01
338	YSPDSFNVS	USH2A	A*01
339	ESMDIFPLGW	SFMBT1	A*01/ A*25
340	SVDSNLVAY	DMXL1	A*01
341	PANYLGKMTY	ARHGEF38	A*01/ B*15
342	QTYMDGLLHY	LAMA3	A*01/ B*15
343	YFGNYFTYY	C5orf34	A*01
344	AVNALQSVY	CPA6	A*01/ B*15
345	NTMDAVPRIDHY	SLC12A2	A*01
346	VAGLEAGVLY	UMODL1	A*01
347	SADHPGLTF	FREM2	A*01/ C*05
348	DSTDGCLLSF	TBC1D16	A*01
349	HLLSVSLYY	OR5AC2,OR5H14,OR5H2,OR5H6	A*01
350	LTDPQVSYV	FARP2	A*01
351	VLDPMLDFY	FAM46D	A*01
352	YPVVVAESMY	FAM46D	A*01
353	RLNGSVASY	FAM46D	A*01
354	EIIRYIFAY	HPGDS	A*01/ A*26
355	MADRGEARL	RMI2	A*01/ C*04
356	NSENHILKY	C12orf56	A*01
357	MSPDIALLYL	OVCH1	A*01
358	YMSPDIALLY	OVCH1	A*01

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
359	NKEINYFMY	ADCY10	A*01/ A*32
360	RFDDINQEF	DNAH17	A*01/ C*04
361	FTAEEGQLY	AR	A*01
362	SGALDEAAAY	AR	A*01
363	LTDRDVSFY	MROH2B	A*01
364	DTGYLQLYY	STON2	A*01
365	FVDTKVPEH	ABCC12	A*01
366	ITVDVRDEF	STON2	A*01/ B*57
367	LTDGTGYLQLY	STON2	A*01
368	ESAATGQLDY	TNR	A*01
369	AVMEAAFVY	TXNDC16	A*01/ A*29
370	RLSTIRHLY	MXRA5	A*01/ A*32
371	WSDSTSQTIY	SH3PXD2A	A*01
372	SRSDFEWVY	DEGS2	A*01/ C*07
373	FHADSDDES F	CDCA7	A*01/ B*38
374	LTSVVVTLW	CDK6	A*01/ B*57
375	ASSLDSLHY	PTPRT	A*01
376	EDDEDEDLY	HSD17B4	A*01
377	YADPSANRDLL	ST8SIA5	A*01/ B*35
378	TAKAPSTEY	GALNT5	A*01/ B*15
379	SLIIDDEY	FSIP2	A*01/ B*35
380	VACGNNPVY	FSIP2	A*01/ B*15
381	ETSFSTSHY	NRG1	A*01/ A*26
382	YEPATMEQY	MYO10	A*01
383	PPDHAVGRTKY	GCNT2	A*01
384	RFRSITQSY	RAB30	A*01/ A*30
385	SANALILTY	RAB30	A*01/ B*35

Таблица 2: Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением, ассоциация которых с раком не была известна ранее

SEQ ID No.	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
386	NSALNPLLY	KISS1R	A*01
387	LMEKEDYHSLY	TYR, TYRL	A*01
388	YTAHVGYSMY	MSX1	A*01
389	YYDLVESTF	DNTT	A*01
390	FSEPFHLIVSY	FCRLA	A*01
391	GSNPARYEF	MAGEA4	A*01/ B*57

SEQ ID No.	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
392	TQHFVQENY	MAGEA3	A*01/ B*15
393	QVWGGQPVY	PMEL	A*01/ B*35
394	QVPLDCVLY	PMEL	A*01
395	ILKGGSGTY	PMEL	A*01/ B*15
396	LPDPNVQKY	PRDM15	A*01/ C*04
397	NSAINPLIY	NPSR1	A*01
398	YYYDTHNTY	SLC12A2	A*01/ C*14

Таблица 3: Пептиды по изобретению, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии.

SEQ ID No.	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
399	YVGKEHMFY	MAGEA9, MAGEA9B	A*01
400	NTDNNLAVY	CXorf61	A*01
401	VWSNVTPCLKF	MMP12	A*01
402	VLYPVPLESY	PRAME	A*01
403	SADDIRGIQSLY	MMP12	A*01
404	FVDNQYWRY	MMP12	A*01
405	STDIGALMY	MMP1	A*01
406	SDVTPLTF	MMP11	A*01
407	VSIRNTLLY	FLT3	A*01
408	VWSDVTPLTF	MMP11	A*01
409	YTFRYPLSL	MMP11	A*01
410	KTWAHCMSY	KISS1R	A*01
411	LLDAEPPILY	ESR1	A*01
412	AAAANAQVY	ESR1	A*01
413	TDTLIHLM	ESR1	A*01
414	LTEGHSGNYY	FCRL5	A*01
415	VWSDVTPLNF	MMP13	A*01
416	LSSPVHLDF	FCRL5	A*01
417	KLDRSVFTAY	FAM111B	A*01
418	LLDEGAMLLY	NLRP7	A*01
419	FPTEVTPHAF	PTPRZ1	A*01
420	VTDLEMPHY	PTPRZ1	A*01
421	RSDPGGGGLAY	MEX3B	A*01
422	ALNPYQYQY	DLX5	A*01
423	LLDEGAKLLY	NLRP2	A*01

SEQ ID No.	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
424	NVDPVQHTY	AGRN	A*01
425	VTEEPQRLFY	BMF	A*01
426	RSFNGLLTMY	LAMB3	A*01
427	LTDYINANY	PTPRZ1	A*01
428	IINESLLFY	GPR143	A*01
429	VSDSECLSR Y	LAMA1	A*01
430	NTDPTAPPY	CDH3	A*01
431	ASSTDSASY Y	APOB	A*01
432	LQSSGLTLLL	MSLNL	A*01

Как следует из представленных выше таблиц, многие из предпочтительных пептидов по изобретению, неожиданным образом, способны связываться с каждым из по меньшей мере двух аллотипов HLA. Это обеспечивает, в частности, возможность более широкого применения данных пептидов.

Настоящее изобретение, кроме того, относится в общем к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении пролиферативных заболеваний, таких как, например, острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рака мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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: 398. Более предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации –

выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 21 (см. Таблицу), и их применение в иммунотерапии острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, и предпочтительно острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для – предпочтительно комбинированного – лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы: острый миелоидный лейкоз, рак молочной железы, холангиоцелочная карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак желчного пузыря, глиобластома, рак желудка, гепатоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, неходжкинская лимфома, рак легких (в том числе немелкоклеточный рак легких-аденокарцинома, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак яичника, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, рак мочевого пузыря, рак матки и эндометрия.

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: 398.

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), в частности, к растворимым ТКР и клонированным ТКР, встроенным в аутологичные или аллогенные Т-клетки, и способам их получения, а также к естественным киллерным клеткам (NK) 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 последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398, предпочтительно содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 21 или 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 аберрантно 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 производстве 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 относится далее к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиокарциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатокарциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, и предпочтительно клетки острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиокарциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатокарциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в настоящем документе называемым «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза рака,

предпочтительно острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия. В роли маркера может выступать избыточная презентация самого(их) пептида(ов) или избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии, и, наиболее предпочтительно, иммунотерапии, направленной на ту же мишень, которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР.

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

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

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 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 эпитопы или эпитопы. Олигопептиды обычно бывают менее чем около 30 аминокислотных остатков в длину и более чем около 15 аминокислот в длину.

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

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий такую молекулу, является «иммуногенным» (и, таким образом, «иммуногеном» в рамках настоящего изобретения), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое

определение как способность индуцировать Т-клеточный ответ. Таким образом, «иммуноген» будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ. В другом аспекте иммуноген может быть пептидом, комплексом пептида и МНС, олигопептидом и/или белком, используемым для получения специфических антител или ТКР против него.

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

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

Таблица 4: Значения частоты экспрессии F для серотипов HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44. Частоты встречаемости гаплотипов Gf получены из исследования, в котором использовались данные HLA-типирования из реестра для более чем 6,5 миллионов доноров-добровольцев из США (Gragert et al., 2013). Частота гаплотипа - это частота обособленного аллеля на отдельной хромосоме. В связи с диплоидным набором хромосом в клетках млекопитающих частота встречаемости этого аллеля в генотипе выше и может быть рассчитана при помощи принципа Харди-Вайнберга ($F = 1 - (1 - Gf)^2$).

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля (F)
A*02	Афроамериканцы (N=28557)	32,3%

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля (F)
	Белые европейцы (N=1242890)	49,3%
	Японцы (N=24582)	42,7%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	46,1%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	30,4%
A*01	Афроамериканцы (N=28557)	10,2%
	Белые европейцы (N=1242890)	30,2%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,0%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	21,0%
A*03	Афроамериканцы (N=28557)	14,8%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,4%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,4%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,6%
A*24	Афроамериканцы (N=28557)	2,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	8,6%
	Японцы (N=24582)	35,5%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	13,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	16,9%
B*07	Афроамериканцы (N=28557)	14,7%
	Белые европейцы (N=1242890)	25,0%
	Японцы (N=24582)	11,4%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	12,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,4%
B*08	Афроамериканцы (N=28557)	6,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	21,6%

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля (F)
	Японцы (N=24582)	1,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	7,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	6,2%
В*44	Афроамериканцы (N=28557)	10,6%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,9%
	Японцы (N=24582)	13,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	18,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	13,1%

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

Если пептиды А*01 по изобретению скомбинировать с пептидами, связывающимися с другим аллелем, например А*24, лечение может пройти более высокий процент любой популяции пациентов по сравнению с охватом 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.allelefrequencies.net).

Таблица 5: Охват HLA-аллелем популяции европеоидной расы (рассчитано в соответствии с (Gragert et al., 2013)).

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

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

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

В контексте настоящего описания понятие «нуклеотид, кодирующий пептид», относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид, включая искусственные (сделанные человеком) старт- и стоп-кодоны, совместимые с биологической системой, которой должна экспрессироваться последовательность,

например, дендритная клетка или другая клеточная система, пригодная для получения ТКР.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

млекопитающее, например, кролику или мыши, также включая человека; причем такой иммунный ответ принимает форму стимуляции Т-клеточного ответа у животного-реципиента, такого как человек. Альтернативно «активный фрагмент» может также быть использован для инициации ответа Т-клетки *in vitro*.

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

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

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

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

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

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

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

Как было упомянуто выше, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398, 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 (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Под «вариантом» данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы MHC, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Godkin et al., 1997; Rammensee et al., 1999), 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: 398, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохраняют ли такие варианты способность связываться с молекулами MHC I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

Исходные (немодифицированные) пептиды, раскрываемые в данном описании, могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких остатков в различных, возможно отобранных, участках по длине пептидной цепи, если не заявлено иное. Предпочтительно, если такие замены расположены на конце аминокислотной цепи. Такие замены могут носить консервативный характер, например, когда одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, так же как при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативной будет замена аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, как, например, при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей внутри семейств встречающихся в природе гомологичных

белков определенные замены аминокислот допускаются чаще, чем другие, и они часто связаны со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и таковой является основа определения «консервативных замен».

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

В одном аспекте консервативные замены могут включать те, что описаны Dayhoff в работе «The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5», *Natl. Biomedical Research*, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки. Например, в одном аспекте аминокислоты, которые относятся к одной из следующих групп, могут быть заменены на другие, что представляет собой консервативную замену: Группа 1: аланин (A), пролин (P), глицин (G), аспарагин (N), серин (S), треонин (T); группа 2: цистеин (C), серин (S), тирозин (Y), треонин (T); группа 3: валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), аланин (A), фенилаланин (F); группа 4: лизин (K), аргинин (R), гистидин (H); группа 5: фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W), гистидин (H); и группа 6: аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E). В одном аспекте консервативная аминокислотная замена может быть выбрана из следующих T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G, и/или T→S.

В одном аспекте консервативная аминокислотная замена может включать замену одной аминокислоты на другую аминокислоту из одного и того же класса, например, (1) неполярные: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) незаряженные полярные: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; и (4) основные: Lys, Arg, His.

Другие консервативные аминокислотные замены могут быть осуществлены по следующему принципу: (1) ароматические: Phe, Tyr, His; (2) доноры протонов: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; и (3) акцепторы протонов: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (см., например, патент США № 10 106 805, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки).

В другом аспекте консервативные замены могут быть осуществлены в соответствии с таблицей А. Способы предсказания толерантности к белковой модификации могут быть взяты, например, из работы Guo и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101(25):9205-9210 (2004), содержание которой в полном объеме включено путем ссылки.

Таблица А.

Консервативные аминокислотные замены	
Аминокислота	Замены (иные известны из уровня техники)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

В другом аспекте консервативные замены могут быть такими, как показано в Таблице Б под заголовком «Консервативные замены». Если такие замены приводят в результате к изменениям в биологической активности, тогда могут быть произведены дополнительные существенные изменения, названные под заголовком «Примеры замен» в Таблице Б, и при необходимости проведен скрининг продуктов.

Таблица Б.

Аминокислотные замены		
Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные замены	Примеры замен
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Ile	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

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

Таблица 6. Варианты и мотив пептидов в соответствии с SEQ ID NO: 1, 4, 9, 10 и 12

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Seq ID No 1	T	L	D	S	T	R	T	L	Y	
Вариант		S								
		S							A	
		S	E							
		S	E						A	
		T								
		T							A	
		T	E							
		T	E						A	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Seq ID No 4	R	I	E	A	I	R	A	E	Y	
Вариант		S	D							
		S	D						A	
		S								
		S							A	
		T	D							
		T	D						A	
		T								
		T							A	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Seq ID No 9	Q	L	D	S	T	L	D	S	Y	
Вариант		S								
		S							A	
		S	E							
		S	E						A	
		T								

		T							A	
		T	E							
		T	E						A	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Seq ID No 10	V	S	E	R	T	G	I	S	Y	
Variant			D							
			D						A	
									A	
		T	D							
		T	D						A	
		T								
		T							A	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Seq ID No 12	Y	T	D	F	V	G	E	G	L	Y
Вариант		S								
		S								A
		S	E							
		S	E							A
										A
			E							
			E							A

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 7.

Таблица 7: Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

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

Соответственно, в настоящем изобретении 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: 398.

«Состоит по существу из» подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398 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, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}=\text{CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-}$ и $-\text{CH}_2\text{SO-}$. 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 аминокальдегида и аминокислоты в присутствии 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, данзильные или трет-бутилоксикарбонильные группы, могут быть добавлены к аминным концам пептидов. Подобным образом, ацетильная группа или 9-флуоренилметоксикарбонильная группа может быть размещена на аминных концах пептидов. Кроме того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа может быть добавлена к карбоксильным концам пептидов.

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

Подобным образом, пептид или вариант по изобретению может быть модифицирован химическим способом посредством реакции отдельных аминокислот как до, так и после синтеза пептида. Примеры таких модификаций хорошо известны из уровня техники и обобщаются, например, в работе R. Lundblad,

Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. KPK Press, 2004(Lundblad, 2004), которая включена в описание по ссылке. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксилирования 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 глютаминовой 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 α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения полиэтиленгликоля и основным сайтом модификации при гликозилировании белков. Остатки метионина в белках могут быть модифицированы, например, с помощью йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

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

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

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

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

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к не встречающемуся в природе пептиду, где указанный пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398 и был получен синтетическим способом (например, синтезирован) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов хорошо известны в данной области. Соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов по своему состоянию(ям) *in vivo*, так как синтезированные пептиды не являются солями *in vivo*. Не встречающаяся в природе солевая форма пептида опосредует растворимость пептида, в частности, в контексте фармацевтических композиций, включающих пептиды, например вакцин на основе пептидов, раскрытых в настоящем описании. Достаточная и по меньшей мере существенная растворимость пептида(ов) необходима для эффективного введения пептидов субъекту, подлежащему лечению. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями пептидов. Соли в соответствии с изобретением включают щелочные и щелочноземельные соли, такие как соли рядов Гофмейстера, включающие в качестве анионов PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- и в качестве катионов NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ba^{2+} . В частности, соли выбраны из $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 и $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. Особенно

предпочтительными являются ацетат NH_4 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl и CaCl_2 , такие как например, хлоридные или ацетатные (трифторацетатные) соли.

Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высоко щелочелабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глютаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамин (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глютамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза

пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

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

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

В целях выбора презентруемых в 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, Фигуру 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 в результате последовательности пептида подтверждали сравнением картины фрагментации природных опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), записанной на образцах острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия ($N = 155$ образцов), 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 первичной ткани раковой опухоли, полученной от 155 пациентов с острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномой,

хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка, гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, раком легких (в том числе немелкоклеточным раком легких-аденокарциномой, плоскоклеточным немелкоклеточным раком легких и мелкоклеточным раком легких), раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, карциномой мочевого пузыря, раком матки и эндометрия.

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

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

Комплексы HLA-пептид из образцов ткани острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, были очищены; HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС (см. Пример 1). Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, что подтверждает их презентацию на клетках острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных тканях острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия и на нормальных тканях, были подвергнуты количественному анализу с помощью ЖХ/МС без использования изотопной метки, с использованием подсчета ионов. Метод основан на предположении, что площади пика пептида при анализе методом ЖХ/МС коррелируют с его содержанием в образце. Все количественные сигналы пептида в различных экспериментах с использованием ЖХ/МС были нормализованы, исходя из основной тенденции, было вычислено их среднее значение на образец, и сведены в гистограмму в т. н. профиль презентации. В профиле презентации консолидированы различные методы анализа, такие как поиск в банке данных белков, спектральная кластеризация, деконволюция состояния заряда (разряд) и выравнивание времени удерживания и нормализация.

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

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний / опухолей, предпочтительно острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, которые презентируют в избытке или исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на первичных образцах острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия человека.

Как было показано, 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 раковых тканях по сравнению с нормальными тканями – понятие «нормальные ткани» в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки крови, кровеносных сосудов, головного мозга, сердца, печени, легких, желчного протока, мочевого пузыря, костного мозга, пищевода, толстой кишки, почки, периферического нерва, поджелудочной железы, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, щитовидной

железы, трахеи или клетки других нормальных тканей, что демонстрирует высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. Пример 2). Более того, сами пептиды в высшей степени избыточно презентуются на опухолевой ткани – понятие «опухолевая ткань» в связи с настоящим изобретением подразумевает образец от пациента, страдающего от острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, но не на нормальных тканях (см. Пример 1).

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами. Т-клетки могут разрушать клетки, презентующие распознанный комплекс HLA/пептид; к примеру, клетки острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, презентующие полученные пептиды.

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентуются и, поэтому, могут использоваться для получения антител и/или ТКР, такие как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. Пример 3, Пример 4). Кроме того,

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

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

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

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

Понятие «Т-клеточный рецептор» (аббревиатура ТКР) относится к гетеродимерной молекуле, включающей альфа-полипептидную цепь (альфа-цепь) и бета-полипептидную цепь (бета-цепь), где гетеродимерный рецептор способен связываться с пептидным антигеном, презентруемым молекулой HLA. 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 заякоривают альфа- и бета-цепи на клеточной мембране.

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

ТКР по настоящему изобретению предпочтительно связываются с комплексом пептида и молекулы HLA с аффинностью связывания (KD) около 100 мкМ или ниже, около 50 мкМ или ниже, около 25 мкМ или ниже или около 10 мкМ или ниже. Более предпочтительными являются высокоаффинные ТКР с 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 образуют дисульфидную связь между последовательностью константного домена TRAC и последовательностью константного домена TRBC1 или TRBC2 ТКР.

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

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

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

В одном варианте осуществления ТКР, содержащий по меньшей мере одну мутацию в альфа-цепи ТКР и/или бета-цепи ТКР, имеет аффинность связывания по отношению к и/или полупериод связывания по отношению к комплексу пептида

и молекулы HLA, которые по меньшей мере вдвое выше, чем у ТКР, содержащего альфа-цепь ТКР без мутаций и/или бета-цепь ТКР без мутаций. Усиление аффинности опухолеспецифических ТКР, а также ее использование, опирается на существование «окна» с оптимальными показателями аффинности для ТКР. Существование такого окна основано на наблюдениях, что ТКР, специфические для HLA-A1-рестриктированных патогенов, обладают показателями KD, которые, в основном, примерно в 10 раз ниже по сравнению с ТКР, специфическими для HLA-A1-рестриктированных опухолеассоциированных аутоантигенов (это также применимо к другим аллелям). Сейчас известно, хотя опухолевые антигены имеют иммуногенный потенциал, поскольку опухоли возникают из собственных клеток индивида, только мутантные белки или белки с изменениями в трансляционном процессинге будут восприниматься иммунной системой как чужеродные. Антигены, уровень которых повышен или которые экспрессируются в избытке (так называемые аутоантигены), не будут в обязательном порядке вызывать функциональный иммунный ответ против опухоли: Т-клетки, экспрессирующие ТКР, которые являются высоко активными по отношению к данным антигенам, будут подвергаться отрицательному отбору внутри вилочковой железы в процессе, известном как центральная толерантность, что означает, что останутся лишь Т-клетки с низкоаффинными ТКР к аутоантигенам. Поэтому аффинность ТКР или вариантов согласно настоящему описанию по отношению к пептидам может быть усилена способами, хорошо известными из уровня техники.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает инкубацию МКПК HLA-A*01-отрицательных здоровых доноров с A*01/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, инкубацию МКПК, полученных у трансгенной мыши, с 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 авидность. Аликвота конечного продукта затем используется для трансдукции целевой популяции Т-клеток (как правило, очищенных от МКПК пациента), которую культивируют перед инфузией пациенту.

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

Для увеличения уровня экспрессии нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть функционально связаны с сильными промоторами, такими как длинные терминальные повторы ретровируса (LTR), цитомегаловируса (CMV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) U3, фосфоглицерат-киназой (PGK), β -актином, убиквитином и комбинированным промотором вируса обезьян 40 (SV40)/CD43, фактором элонгации (EF)-1a и промотором вируса некроза 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).

Нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть кодон-оптимизированы для увеличения экспрессии клеткой-хозяином. Избыточность генетического кода позволяет кодирование некоторых аминокислот более чем одним кодоном, однако некоторые конкретные кодоны менее «оптимальны», чем другие, по причине относительной доступности подходящих

тРНК, а также других факторов (Gustafsson et al., 2004). Как было показано, модификации последовательностей генов ТКР-альфа и ТКР-бета, так чтобы каждая аминокислота кодировалась оптимальным кодоном для экспрессии генов млекопитающих, а также удаление нестабильных мотивов мРНК или криптоических сайтов сплайсинга, существенно усиливали экспрессию генов ТКР-альфа и ТКР-бета (Scholten et al., 2006).

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

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

В одном варианте осуществления клетка-хозяин генетически модифицирована, чтобы экспрессировать ТКР согласно настоящему описанию. В предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин является человеческой Т-клеткой или

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

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

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

использовании фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин и тому подобных.

В одном 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 адъювантом (см. ниже) или использоваться в комбинации с иммуностимулирующими цитокинами или же вводиться с подходящей системой доставки, например, липосомами. Пептид может быть также конъюгирован с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. WO 95/18145 и (Longenecker et al., 1993)). Пептид может быть также меченым или может быть слитым белком или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем изобретении, как ожидается, стимулируют CD4+ или CD8+ Т-клетки. Тем не менее, стимуляция CD8 Т-клеток более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов MHC 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: 398, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

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

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

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

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

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящем хозяине для получения полипептида, включающего пептид или вариант по изобретению. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант по изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению. Такие методики включают те, что раскрыты, например, в патентах США №№ 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, желательно ли поддержание в эписомальной или интеграционной форме.

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

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

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

Известно множество систем экспрессии, включающих бактерии (например, *E. coli* и *Bacillus subtilis*), дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae*), мицелиальные грибы (например, *Aspergillus spec.*), растительные клетки, клетки животных и насекомых. Предпочтительно, чтобы система была клетками млекопитающих,

такими как клетки CHO, имеющимися в наличии в Американской коллекции типовых культур ATCC.

Типичная клеточная векторная плазмида 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 (Ylps) и включают дрожжевые селективируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми плазмидами с центромерами (Ycp). Основанные на промоторе CMV векторы (например, компании Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазматическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, 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 MHC I, так и MHC 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* штамм DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Мэриленд, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типовых культур («American Type Culture Collection» (ATCC), Роквил, Мэриленд, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают клетки дрожжей, насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как линии фибробластных клеток и клеток толстой кишки таких видов как мышь, крыса, обезьяна или человек. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Калифорния 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в

наличии в ATCC как CCL61, эмбриональные клетки швейцарской мыши линии NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, клетки COS-1 из почек обезьяны, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650, и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками почек эмбрионов человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфицироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в учебном пособии авторов Paulina Balbás и Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols », часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9, и другой литературе, известной специалисту данной области.

Трансформация соответствующих клеток-хозяев с помощью ДНК-конструкции по настоящему изобретению производится при помощи хорошо известных способов, которые обычно зависят от типа используемого вектора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, работу Cohen и соавт.(Cohen et al., 1972) и (Green and Sambrook, 2012). Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт.(Sherman et al., 1986). Также подходит метод Бигса (Beggs) (Beggs, 1978). Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты, например, фосфат кальция и DEAE-декстран или липосомальные составы, имеются в наличии в 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 кислотную фосфатазу (PAP), были одобрены Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) 29 апреля 2010 г. для применения при лечении метастатического HRPC (гормон-рефрактерного рака предстательной железы), протекающего бессимптомно или с минимально выраженными симптомами (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. Вводятся 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 (TH) 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, CyaA, 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, ОМ-174, ОМ-197-МР-ЕС, ОНТАК, OspA, векторную систему PepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстрани микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонины, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъюванты, такие как Detox компании Ribi, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотнесены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF- α), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5 849 589, специально включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые

антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже бóльшую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 В1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двухцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

Другие примеры пригодных к использованию адъювантов включают, но без ограничения, химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги 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, ингибиторы контрольных иммунных точек, в том числе

ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб и цемиплимаб, 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, атезолизумаб, бевацизумаб, интерферон-альфа, интерферон-бета, CpG олигонуклеотиды и их производные, поли-(I:C) и ее производные, РНК, силденафил, составы из твердых микрочастиц с PLG, виросомы, интерлейкин (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-21 и ИЛ-23.

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, внутрикожное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и – факультативно – другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены вместе с иммуностимулирующими агентами, такими как цитокины. Обширный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, может быть взят, например, из работы A. Kibbe, «Handbook of Pharmaceutical Excipients» (Kibbe, 2000). Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и/или лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Примеры фармацевтических композиций могут быть взяты, например, из 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 опухолеассоциированных пептидов гарантирует, что на каждой отдельной опухоли имеются по меньшей мере некоторые из этих мишеней. Композиция разработана исходя из того, что, как ожидается, каждая опухоль экспрессирует несколько антигенов и охватывает несколько независимых сигнальных путей, необходимых для роста и сохранения опухоли. Таким образом, вакцина в виде «готовой к

применению» может быть легко использована для более крупной популяции пациентов. Это означает, что предварительный отбор пациентов для лечения вакциной может быть ограничен HLA-типированием, не требуя никакого дополнительного анализа биомаркеров экспрессии антигена, однако при этом остается гарантия одновременного воздействия на несколько мишеней в виде индуцированного иммунного ответа, что важно для эффективности (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

В контексте настоящего описания понятие «каркас» относится к молекуле, которая специфически связывается с (например, антигенной) детерминантой. В одном варианте осуществления каркас способен направлять единицу, к которой он прикреплен (например, (второй) антиген-связывающий элемент) к сайту-мишени, например, к конкретному виду опухолевых клеток или стромы опухоли, несущих антигенную детерминанту (например, комплекс пептида с МНС в соответствии с настоящей патентной заявкой). В другом варианте осуществления каркас способен активировать пути передачи сигналов за счет его антигена-мишени, например, антигена комплекса Т-клеточного рецептора. Каркасы включают, но без ограничения, антитела и их фрагменты, антигенсвязывающие домены антитела, включающие 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 уничтожать 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 и антитело к CD28.

Для получения дополнительной 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 неопухолежденные 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: 398 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 (предпочтительно пептидом в соответствии с настоящим изобретением), причем способ включает: иммунизацию генетически модифицированного, не являющегося человеком млекопитающего, содержащего клетки, экспрессирующие молекулы указанного главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса с растворимой формой молекулы МНС I или II класса в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном; выделение молекул мРНК из продуцирующих антитела клеток указанного не являющегося человеком млекопитающего; создание библиотеки

фагового отображения, содержащей фаги, экспонирующие белковые молекулы, закодированные указанными молекулами мРНК; и выделение, по меньшей мере, одного фага из указанной библиотеки фагового отображения, причем указанный, по меньшей мере, один фаг, экспонирует на поверхности указанное антитело, специфически связывающееся с указанным главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном.

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

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

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

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ

ID NO: 398, 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 с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 398 или его варианту, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 398, 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: 398.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности, в лечении острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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: 398 или указанный вариант аминокислотной последовательности.

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.

В одном аспекте активированные Т-лимфоциты могут быть получены с помощью контактирования Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, презентируемыми на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, на период времени, достаточного для активации указанных Т-клеток.

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, клетки-мишени которого аберрантно 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 способу лечения пациента, больного раком, раковые клетки которого аберрантно 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.

В одном аспекте Т-клетки могут быть аутологичными по отношению к пациенту. В другом аспекте Т-клетки могут быть получены у здорового донора. В другом аспекте Т-клетки могут быть получены из опухоль-инфильтрующих лимфоцитов или моноклеарных клеток периферической крови. В другом аспекте иммунный ответ может включать ответ цитотоксических Т-клеток.

Настоящее изобретение далее относится к способу вызывания иммунного ответа у пациента, больного раком, раковые клетки которого аберрантно 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 или активированного цитотоксического Т-лимфоцита в

соответствии с настоящим изобретением в качестве лекарственного средства или в производстве 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 относится далее к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия или клетками других солидных или гематологических опухолей, таких как клетки острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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 острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия. Настоящее изобретение относится также к применению этих новых мишеней для лечения рака.

Понятие «антитело» или «антитела» используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или «полным» молекулам иммуноглобулина в понятие «антитела» включены также фрагменты (например, участки CDR, фрагменты Fv, Fab и Fc) или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с (поли)пептидным маркером острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, доставляют токсин к клетке острого

миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептида-маркера острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия) в соответствии с настоящим изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной

железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия 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: 398, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, клетках дрожжей, насекомых или млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, использованным для получения антитела по изобретению.

Специалисту данной области будет понятно, что получение двух или более различных наборов моноклональных или поликлональных антител увеличивает вероятность получения антитела со специфичностью и аффинностью, необходимыми для предназначенного для него использования (например, для ELISA, иммуногистохимии, визуализации *in vivo*, терапии на основе иммунотоксина). Антитела испытывают на желаемую для них активность с помощью известных методов в соответствии с целью применения антител

(например, ELISA, иммуногистохимия, иммунотерапия и т. д.; для получения дальнейшей информации по генерированию и испытанию антител см., например, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Например, антитела могут быть исследованы с помощью ELISA или метода иммунного блоттинга (Western-blot), иммуногистохимического окрашивания зафиксированных формалином образцов раковых тканей или замороженных тканевых срезов. После первоначального определения их характеристик *in vitro* антитела, предназначенные для терапевтического или диагностического применения *in vivo* исследуют в соответствии с известными методами клинического исследования.

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

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены при использовании 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')₂ и фрагмент pFc'.

Фрагменты антител, как связанные с другими последовательностями, так и не связанные, могут также включать вставки, делеции, замещения или другие выбранные модификации конкретных участков или аминокислотных остатков при условии, что активность фрагмента незначительно изменена или повреждена по сравнению с немодифицированным антителом или фрагментом антитела. Данные модификации могут внести некоторые дополнительные свойства, такие как добавление/удаление аминокислот, способных к дисульфидному связыванию, увеличение их биологической стойкости, изменение их секреторных характеристик и т. д. В любом случае, фрагмент антитела должен обладать свойством

биологической активности, таким как активностью связывания, регуляцией связывания на связывающем домене и т. д. Функциональные или активные участки антитела могут быть идентифицированы при мутагенезе конкретного участка белка с последующей экспрессией и исследованием экспрессированного полипептида. Такие способы полностью очевидны для опытного специалиста данной области и могут включать сайт-специфический мутагенез нуклеиновой кислоты, кодирующей фрагмент антитела.

Антитела по изобретению могут далее включать гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышиных) 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 комплементарных детерминантных областей (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающая способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в 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 медикаментов. Типичная суточная доза антител при монотерапии антителами может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы,

плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака у субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака.

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

переноса. Дополнительную информацию можно найти в патентных заявках WO 2004/033685A1 и WO 2004/074322A1. 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.

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

Антитела для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию; флюороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, флуоресцеин, родамин, эозин и другие флюорофоры, радиоизотопы, золото, гадолиний и другие лантаноиды, парамагнитное железо, фтор-18 и другие позитронно-активные радионуклиды. Более того, зонды могут быть би- или мультифункциональными и обнаруживаться более чем одним из приведенных способов. Данные антитела могут быть помечены напрямую или опосредованно указанными зондами. Присоединение зондов к антителам включает ковалентное присоединение зонда, внедрение зонда в антитело и ковалентное присоединение хелатирующего

соединения для присоединения зонда, среди других широко признанных методов в данной области. Для иммуногистохимических исследований образец пораженной ткани может быть свежим или замороженным или может быть залит парафином и зафиксирован таким консервантом как формалин. Зафиксированный или залитый срез приводят в контакт с помеченным первичным антителом и вторичным антителом, где антитело используется для обнаружения экспрессии белков *in situ*.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ получения активированных Т-клеток *in vitro*, причем способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации 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 ТАР или имеется его пониженный уровень или пониженная функциональная активность. Подходящие клетки с дефицитом пептидного транспортера ТАР, включают Т2, RMA-S и клетки дрозифилы. ТАР - это транспортер, связанный с процессингом антигена.

Линия человеческих клеток с недостаточностью Т2, 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 дрозифилы, 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 последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398 или вариант его 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 (CHO), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи и инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (Porta et al., 1994), в которой описывается разработка мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивной системы презентации чужеродных пептидов.

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 398.

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 аберрантно 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 аберрантно экспрессируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность по изобретению, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, как определено выше.

Под понятием «аберрантно 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 Gattinoni 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 производстве 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) факультативно – второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава; и

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

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

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

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

После смешивания разбавителя и лиофилизированного состава окончательная концентрация пептида в восстановленном составе составляет предпочтительно по меньшей мере 0,15 мг/мл/пептида (=75 мкг) и, предпочтительно, не более чем

3 мг/мл/пептида (=1500 мкг). Набор может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

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

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

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

фармацевтически приемлемой жидкости. Лечебный комплект будет предпочтительно содержать аппарат (например, одну или более игл, шприцы, глазные пипетки, пипетки и т. д.), который обеспечивает введение веществ по изобретению, которые являются компонентами настоящего набора.

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

Так как пептиды по изобретению были выделены из клеток острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, лекарственное средство по изобретению предпочтительно используется для лечения острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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 различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями, больных острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиокарциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка,

гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, раком легких (в том числе немелкоклеточным раком легких-аденокарциномой, плоскоклеточным немелкоклеточным раком легких и мелкоклеточным раком легких), раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, карциномой мочевого пузыря и раком матки и эндометрия. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами МНС I класса и МНС II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами МНС I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, хранилище может содержать маркерные пептиды HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов положительного контроля, полученных «не из собственного» антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из «собственных» антигенов. И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

Пептиды TUMAP для хранилища были идентифицированы с помощью интегрированного подхода функциональной геномики, комбинирующего анализ экспрессии генов, масс-спектрометрию и Т-клеточную иммунологию (XPresident®).

Этот подход гарантирует, что только те пептиды TUMAP, которые действительно присутствуют в большом проценте опухолей, но не экспрессируются или экспрессируются лишь минимально на нормальной ткани, были выбраны для последующего анализа. В целях первоначального отбора пептидов образцы ткани острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, 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 острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия), 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 острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка, гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, раком легких (в том числе немелкоклеточным раком легких-аденокарциномой, плоскоклеточным немелкоклеточным раком легких и мелкоклеточным раком легких), раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, карциномой мочевого пузыря, раком матки и эндометрия.

В одном из аспектов пептиды предварительно прошли скрининг на иммуногенность до их включения в хранилище. В качестве примера, но не для ограничения изобретения, иммуногенность пептидов, включенных в хранилище, определяется способом, включающим прайминг Т-клеток *in vitro* посредством повторных стимуляций CD8⁺ Т-клеток здоровых доноров клетками, 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 пациента 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) факультативно, выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) с подтверждением его иммуногенности.

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

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

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

Конечный нерасфасованный раствор разливают во флаконы и хранят при -20°C до использования. Один флакон содержит 700 мкл раствора, содержащего 0,578 мг каждого пептида. Из них 500 мкл (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 клеток острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза,

колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, 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 ткань образца является злокачественной или воспаленной или пораженной заболеванием вообще, или же может использоваться в качестве биомаркера острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия. 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 Фигурах 1А–1N представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях (черные точки). Верхняя часть: Медианные показатели интенсивности МС-сигналов измерений технических репликатов нанесены в виде

точек для единичных HLA-A*01-положительных образцов нормальной ткани (серые точки, левая часть изображения) и опухолевых образцов (черные точки, правая часть изображения), на которых был обнаружен пептид. Прямоугольниками («ящиками») обозначены медианное значение, 25-ый и 75-ый процентиля нормализованного уровня интенсивности сигнала, тогда как «усы» распространяются до самой низкой точки данных, всё еще в пределах 1,5 межквартильного диапазона (IQR) нижнего квартиля и до наивысшей точки данных, всё еще в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска (клетки крови, кровеносные сосуды, головной мозг, печень, легкие: высокий уровень риска, серые точки; органами репродуктивной системы, молочная железа, предстательная железа: низкий риск, серые точки; все остальные органы: средний уровень риска; серые точки). Нижняя часть: Относительная частота обнаружения пептида в каждом органе представлена в виде столбчатой диаграммы. Цифры под графиком обозначают число образцов, на которых был обнаружен пептид из общего числа проанализированных образцов для каждого органа (N = 72 для образцов нормальных тканей, N = 155 для образцов опухолевых тканей). Если пептид был обнаружен на образце, но по техническим причинам не могло быть проведено количественное определение, образец включали в данный график репрезентации частоты обнаружения, но в верхней части фигуры точку не обозначали. Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; кров. сосуды (кровеносные сосуды); голов. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкие; желчн. прот. (желчные протоки); мочев. п. (мочевой пузырь); КМ (костный мозг); пищевод; толст. киш. (толстая кишка); почка; периф. нерв (периферический нерв); кожа; спинной мозг; селезенка; желудок; щитов. жел. (щитовидная железа); трахея. Опухолевые образцы: ОМЛ (острый миелоидный лейкоз); РМЖ (рак молочной железы); ХГК (холангиоцеллюлярная карцинома); ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз); КРК (колоректальный рак); РЖП (рак желчного пузыря); ГБМ (глиобластома); РЖ (рак желудка); РПЖП: рак пищевода-желудочного перехода; ГKK (гепатоцеллюлярная карцинома); ПлККГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи); МЕЛ (меланома); НХЛ (неходжкинская лимфома); НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома);

НМРЛдругие (образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ (рак яичника); РП (рак пищевода); РПЖ (рак поджелудочной железы); РПрЖ (рак предстательной железы); ПКК (почечноклеточная карцинома); МРЛ (мелкоклеточный рак легких); КМП (карцинома мочевого пузыря); РЭМ (рак эндометрия и матки).

Фигура 1А) пептид: NSDISIPEY (SEQ ID NO: 16), Фигура 1В) пептид: TSDQLGYSY (SEQ ID NO: 40), Фигура 1С) пептид: HSDLLEDSKY (SEQ ID NO: 41), Фигура 1D) пептид: SSDFDPLVY (SEQ ID NO: 65), Фигура 1Е) пептид: YTELVEEKY (SEQ ID NO: 70), Фигура 1F) пептид: QTDVERIKDTY (SEQ ID NO: 76), Фигура 1G) пептид: QLDSAVKNLY (SEQ ID NO: 78), Фигура 1H) пептид: HMLAAMAY (SEQ ID NO: 296), Фигура 1I) пептид: YTCEECEGQAF (SEQ ID NO.: 316), Фигура 1J) пептид: NTDSMTLNNTAY (SEQ ID NO.: 329), Фигура 1K) пептид: TLDSTRTLY (SEQ ID NO.: 1), Фигура 1L) пептид: YLDSSKPAVY (SEQ ID NO.: 15), Фигура 1M) пептид: PSEVPVDSHY (SEQ ID NO.:28) и Фигура 1N) пептид: LMEKEDYHSLY (SEQ ID NO.: 387).

На Фигурах 2А – 2Р представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые экспрессированы в избытке в различных раковых образцах. Опухолевые (черные точки) и нормальные (серые точки) образцы сгруппированы по органам происхождения. на диаграммах размаха («ящик с усами») представлены медиана, 25-ый и 75-ый процентиля (ящик) значений RPKM плюс усы, которые распространяются до самой низкой точки данных, всё еще в пределах 1,5 межквартильного диапазона (IQR) нижнего квартиля и до наивысшей точки данных, всё еще в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска. FPKM = фрагментов на тысячу пар оснований на миллион картированных ридов. Нормальные образцы: клетки крови; кровен. сосуды (кровеносные сосуды); головной мозг; сердце; печень; легкое; жировая ткань; надпочечник; желчн. прот. (желчные протоки); мочев. п. (мочевой пузырь); КМ (костный мозг); пищевод; глаз; желчн. пуз. (желчный пузырь);

голова и шея; толст. киш. (толстая кишка); тонк. киш. (тонкая кишка); почка; ЛУ (лимфатический узел); периф. нерв (периферический нерв); подж. железа (поджелудочная железа); парацит. (парацитарная железа); брюшина; гипофиз; плевра; скел. мышца (скелетная мышца); кожа; селезенка; желудок; щитов. жел. (щитовидная железа); трахея; мочеточник; молочн. жел. (молочная железа); яичник; плацента; предст. жел. (предстательная железа); семенник; вилочк. жел. (вилочковая железа); матка. Опухолевые образцы: ОМЛ (острый миелоидный лейкоз); РМЖ (рак молочной железы); ХГК (холангиоцеллюлярная карцинома); ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз); КРК (колоректальный рак); РЖП (рак желчного пузыря); ГБМ (глиобластома); РЖ (рак желудка); ГЖК (гепатоцеллюлярная карцинома); ПлКЖШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи); МЕЛ (меланома); НХЛ (неходжкинская лимфома); НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ (рак яичника); РП (рак пищевода); другие (другие виды рака, например, множественная миелома); РПЖ (рак поджелудочной железы); РПрЖ (рак предстательной железы); ПКК (почечноклеточная карцинома); МРЛ (мелкоклеточный рак легких); КМП (карцинома мочевого пузыря); РЭМ (рак эндометрия и матки).

Фигура 2А) Символ гена: MAGEA3, пептид: VDPIGHLY (SEQ ID No.: 2), Фигура 2В) символ гена: SLC6A3, пептид: FGTTTAAEYF (SEQ ID No.: 3), Фигура 2С) символ гена: UMODL1, пептид: ARDPITFSF (SEQ ID No.: 6), Фигура 2D) символ гена: SLC45A3, пептид: ASDHWRGRY (SEQ ID No.: 11), Фигура 2E) символ гена: MAGEA4, пептид: VDPASNTY (SEQ ID No.: 86), Фигура 2F) символ гена: SSX1, пептид: AFDDIATYF (SEQ ID No.: 87), Фигура 2G) символ гена: MAGEA1, пептид: EVYDGREHSAY (SEQ ID No.: 89), Фигура 2H) символ гена: MMP12, пептид: SSDPKAVMF (SEQ ID No.: 95), Фигура 2I) символ гена: UMODL1, пептид: ASDDVRIEVLGY (SEQ ID No.: 7), Фигура 2J) символ гена: C7orf72, пептид: TSRAANIPGY (SEQ ID No.: 8), Фигура 2K) символ гена: CTCFL, пептид: NTHGTGRPY (SEQ ID No.: 13), Фигура 2L) символ гена: SOX14, пептид: DTDPLKAAGL (SEQ ID

No.: 23), Фигура 2M) символ гена: HAS2, HAS3, пептид: IATVIQLFY (SEQ ID No.: 66), Фигура 2N) символ гена: SLC6A3, пептид: CLVLVIVLLY (SEQ ID No.: 91), Фигура 2O) символ гена: UMODL1, пептид: TATLLIVRY (SEQ ID No.: 96), Фигура 2P) символ гена: CDK6, пептид: LTSVVVTLW (SEQ ID No.: 374)

На Фигуре 3 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8⁺ Т-клеток здорового HLA-A*01⁺ донора. CD8⁺ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*01 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID NO. 417 (KLDRSVFTAY) (A, левая секция), с пептидом с SEQ ID NO: 429 (VSDSECLSRV) (B, левая секция), с пептидом с SEQ ID NO: 19 (LTEGHSGNY) (C, левая секция), с пептидом с SEQ ID NO: 33 (SMDPVTGYQY) (D, левая секция), с пептидом с SEQ ID NO: 61 (SSDIVALGGFLY) (E, левая секция), с пептидом с SEQ ID NO: 77 (FTSDTGLEY) (F, левая секция), с пептидом с SEQ ID NO: 83 (DTEFHGGLHY) (G, левая секция). После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью окрашивания димеров, используя A*01/SeqID No 417 (A) или A*01/SeqID No 429 (B), A*01/SeqID No 19 (C), A*01/SeqID No 33 (D), A*01/SeqID No 61 (E), A*01/SeqID No 77 (F) или A*01/SeqID No 83 (G). Правые секции представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*01. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8⁺ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8⁺ лимфоцитов.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентруемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Медицинского центра Лейденского университета (LUMC) (Лейден, Нидерланды), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Клиники св. Саввы (Афины, Греция), Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания), Университетской клиники г. Бонн (Бонн, Германия), Университетской клиники г. Женева (Женева, Швейцария), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия), Осацкого городского университета (ОГУ) (Осака, Япония), Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия).

Нормальные ткани были получены из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США), Capital BioScience Inc. (Роквилл, Мэриленд, США), Центра клинической трансфузиологии г. Тюбингена (Тюбинген, Германия), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия), Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия)

Перед проведением хирургической операции или аутопсии было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после удаления ткани были подвергнуты шоковой заморозке и хранились до выделения TUMAP-пептидов при температуре -70°C или ниже.

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

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

специфического к HLA-DP антителу B7/21, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

Масс-спектрометрический анализ

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазовой хроматографией (nanoAcquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридных масс-спектрометрах LTQ-velos и -fusion (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленного кварца (75 мкм в/д 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 были интерпретированы с помощью программ SEQUEST с фиксированным уровнем ложноположительных обнаружений ($q \leq 0,05$) и дополнительным контролем в ручном режиме. В случае, если идентифицированная последовательность пептида была неопределенной, ее дополнительно подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

Относительное количественное определение методом ЖХ/МС без изотопных меток проводили путем подсчета ионов, т. е. с помощью экстракции и анализа

результатов ЖХ/МС (Mueller et al., 2007). Этот метод основан на предположении, что площадь пика ЖХ/МС сигнала пептида коррелирует с его концентрацией в образце. Извлеченные характеристики обрабатывали с помощью деконволюционного анализа состояния заряда и путем выравнивания времени удерживания (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Наконец, все результаты спектров ЖХ/МС были сопоставлены методом перекрестных ссылок с результатами по идентификации последовательности, чтобы объединить количественные данные различных образцов и тканей в профили презентации пептидов. Количественные данные были нормализованы с применением двухуровневой системы в соответствии с центральной тенденцией с целью учета 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 взаимной согласованности данных и для проверки точности автоматического метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариабельность репликатов. В профиле сравниваются образцы острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на Фигурах 1.

В Таблице 8 показана презентация выбранных пептидов при различных раковых заболеваниях и, таким образом, конкретная значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных раковых заболеваний (например, пептида с последовательностью SEQ ID NO: 21 для рака молочной железы и рака предстательной железы, пептида с последовательностью SEQ ID NO: 47 для меланомы, немелкоклеточного рака легких и рака яичника).

Таблица 8. Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов по настоящему изобретению среди различных видов опухолей.

ОМЛ: острый миелоидный лейкоз; РМЖ: рак молочной железы; ХГК: холангиоцеллюлярная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГМК: гепатоцеллюлярная карцинома; ПлККПШ: плоскоклеточная карцинома головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено: немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома; НМРЛдругие: образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск; НМРЛплоск: плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких; РЯ: рак яичника; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РПрЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечноклеточная карцинома; МРЛ: мелкоклеточный рак легких; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак эндометрия и матки.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
1	TLDSTRTLY	РПрЖ
2	VDPIGHLY	ГМК
3	FGTTPAAEYF	РП
4	RIEAIRAEY	МЕЛ
5	FMVIAGMPLFY	НМРЛплоск
6	ARDPITFSF	ПлККПШ, НМРЛадено
7	ASDDVRIEVGLY	ОМЛ, НМРЛдругие
8	TSRAANIPGY	МЕЛ
9	QLDSTLDSY	РМЖ
10	VSERTGISY	МЕЛ
11	ASDHWGRGY	РПрЖ
12	YTDFVGEGLY	РМЖ, РПрЖ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
13	NTHTGTRPY	НМРЛплоск
14	QSEKEPGQQY	ГКК
15	YLDSSKPAVY	РМЖ, РЭМ
16	NSDISIPEY	РМЖ, РЖ, НХЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ
17	ASWAVLCYY	НМРЛплоск
18	RSDPVSLRY	ГБМ
19	LTEGHSGNY	НХЛ
20	LSAQHRMLA	ГБМ
21	LSSAVNPIIY	МЕЛ
22	VMDTLGLFY	РМЖ, МЕЛ, РПрЖ
23	DTDPLKAAGL	РЖП, ГБМ, РЖ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РЭМ
24	NLDHYTNAY	РЭМ
25	AMMQEAQLAY	НМРЛадено, НМРЛдругие, МРЛ, РЭМ
26	ASDDFRSKY	РП
27	PSEVPVDSHY	ГБМ, МЕЛ
28	PSEVPVDSHY Y	ХГК, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, РЯ
29	TLEDLDNLYNY	НМРЛадено
30	VTTDKPRAY	ПлККГШ
31	VSDHLQAGMLGQ Y	ПлККГШ, РП
32	GTDKQNSTLRY	МЕЛ, НМРЛадено
33	SMDPVTGYQY	МЕЛ
34	SSWSAGENDSY	РМЖ, ХГК, РЖП, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РЭМ
35	SWSAGENDSYS	РМЖ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЭМ
36	MTSTEQSLY	ГКК, МЕЛ
37	MTSTEQSLYY	МЕЛ
38	KSWSSQSSSLMY	ГКК, ПлККГШ, МЕЛ
39	WSQSSSLMY	ОМЛ, РЖП, РЖ, ГКК, НМРЛплоск
40	TSDQLGYSY	МЕЛ
41	HSDLLEDSKY	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, КМП, РЭМ
42	ASDVDTLK	ГБМ
43	ETEPERHLGSY	РПрЖ
44	IPSFNEMVY	ГБМ, НМРЛадено, НМРЛплоск
45	NLDPNKIY	МЕЛ, РП
46	RSDPGGGGLAYAY	ОМЛ, РМЖ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
47	WSDGVPLLY	ГБМ, МЕЛ
50	ITDEDEDMLSY	ГКК
53	YLEDRPLSQLY	МЕЛ, РЯ
54	EVDIHTIHY	РЖП, ПлККГШ, РП
55	ATEGDVLNY	МЕЛ, НХЛ, НМРЛплоск
56	VTEYAEIYQY	ОМЛ
57	ASDPASSTSCY	ГКК
58	YLENSASWY	РЭМ
59	FTDSQGNDIK	МЕЛ
60	MTEKFLFLY	ПлККГШ, РП
61	SSDIVALGGFLY	ОМЛ, РМЖ, НМРЛплоск
62	VSELVTTGHY	ОМЛ, КРК, РЖП, ГБМ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП
63	TSEISQNALMY	НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск
64	TSEISQNALMY	НМРЛадено
65	SSDFDPLVY	РМЖ, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЭМ
67	NVDQNNQNSY	ГБМ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено
68	QSLPEFGLTY	ХГК, РП
69	QSLPEFGLTY	РП
70	YTELVEEKY	РМЖ, ХГК, КРК, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, РЭМ
71	LTDSTTRTTY	КРК, РЖ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ
72	VTDSSTTKIAY	РЖ, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ
73	STDSASY	ГКК
74	EMEQQSQEY	ПлККГШ, РП
75	FTDYELKAY	ГКК
76	QTDVERIKDTY	ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, РЭМ
77	FTSDTGLEY	ОМЛ, НМРЛадено
78	QLDSAVKNLY	РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, МРЛ, КМП, РЭМ
79	ASDLEPRELLSY	РМЖ
80	ELCPLPGTSAY	РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ
81	YSDLHTPGRY	ОМЛ, МРЛ
82	LTEKSHIRY	РМЖ, ГБМ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск
83	DTEFHGGLHY	РМЖ, РЖ, РП, РПЖ
84	ESEMIKFASY	ГКК
85	SSDNYEHWLY	РМЖ, МЕЛ, НМРЛадено

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
87	AFDDIATYF	МРЛ
88	KEVDPAGHSYI	НХЛ
89	EVYDGREHSAY	МЕЛ, РП
90	YEDHFPLLF	МЕЛ, РП
91	CLVLVIVLLY	НМРЛадено
92	TTDDTTAMASAS	РЖП, МЕЛ, НМРЛплоск
93	HLKILSPIY	РМЖ
95	SSDPKAVMF	КРК
96	TATLLIVRY	ОМЛ
97	FPAPPAHWFY	РМЖ
98	NFSDLVFTY	РМЖ
99	AADSNPSEL	РПрЖ
100	TTSSAISWILY	РМЖ
101	SITDVDFIY	РЭМ
102	STIRGELFF	РМЖ
103	ITDTLIHLM	РМЖ
104	ITDTLIHL	РМЖ
107	TTENSGNYY	ХЛЛ
108	NSNLKFLEV	МРЛ
109	ISEDKSISF	КРК
111	TPIPFDKILY	РП
112	KASSVSAEDGY	ГБМ, РЭМ
113	ASCRSSAEY	РЯ
114	AVAAAAGASLY	ОМЛ, МЕЛ, РП
115	NEIDIHSIYFY	РП
116	RSDIGEFEW	ОМЛ
117	SPAKQFNIIY	РЖП
119	TVFDENLSRY	РП
120	LVDENQSWY	НХЛ
121	SADEAHGLL	МЕЛ
122	ISEAPLTEV	МЕЛ
123	LLKAKDILY	ПлККГШ
124	FLKVTGYDKDDY	ГКК
125	FQYELRELY	РЯ
126	TTDPKKFQY	МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ
127	VPFNLITEY	МЕЛ
128	YTEFVDATFTK	ПлККГШ
130	YIGLKGLYF	МЕЛ
131	LEDGIEQSAY	НХЛ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
132	RTHIGYKVY	НМРЛплоск
134	SAPSSSGSPLY	НМРЛплоск
135	TFDKQIVLL	НМРЛдругие
136	RRLNFSGFGY	МРЛ
137	EAYLERIGY	РМЖ
138	IPVHDSVGVTY	МЕЛ
139	PVHDSVGVTY	РЖ, МРЛ, РЭМ
140	SQHIFTVSY	ГБМ, НМРЛплоск
141	DAVAPGREY	РЖП
142	IEKFAVLY	ПлККГШ
143	HVSGQMLYF	РМЖ
144	RTIEGDFLW	ГБМ
145	LSDAVHVEF	ХЛЛ
146	LCATVCGTEQY	ПлККГШ
147	AQVQDTGRY	МЕЛ
148	GTKQWWHARY	ХЛЛ
149	PIMSSSQALY	НМРЛплоск
150	FTTLSDLQTNMA	ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ
151	YEVDTKLLSL	МЕЛ
155	HTMEVTVY	МЕЛ
156	STALSILL	МЕЛ
157	GLIEVVTGY	МЕЛ, РЯ
158	EVTDRNMLAF	ПлККГШ, РЯ, РП
159	RQAPGPARDY	НМРЛплоск
160	EVLGEEMYAY	РПрЖ
161	EAAPDIMHY	МЕЛ, РП
162	IADNPQLSFY	РМЖ
163	KIRAEVLSHY	ХЛЛ
164	KLAGTVFQY	НМРЛплоск
165	VSVYNSYPY	РМЖ
166	YHRICELLSDY	РЖ
167	RAVQPGETY	НМРЛдругие, НМРЛплоск
168	VQPGETYTY	РЖП
169	TVDNANILL	КМП
170	VQIAKGMNY	НМРЛплоск
171	ITDFGLAKL	НМРЛадено
172	FSEPFHLIV	МЕЛ
173	QSTTGVSHY	ХГК
174	TSEVEGLAFVSY	НМРЛплоск

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
175	GLEYEAPKLY	ГБМ
176	HTDLESPSAVY	ГКК, КМП
178	TQRTSFQFY	НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ
179	SSTDFTFASW	ПлККГШ, РЯ, РП
180	AQISDTGRY	МЕЛ
181	SVTDLIGGKW	РП
182	TQPELSSRY	НМРЛадено
183	LADTDLGMTF	РП
184	KTIQEVAGY	ГБМ, ПлККГШ
185	NSDESADSEPHKY	РМЖ
186	AVSSGLFFY	РМЖ
187	TQKSVQVLAY	ГБМ
189	FRGVFVHRY	МЕЛ
190	VSSTVHNLY	РМЖ
191	FTRAFDQLRM	НМРЛадено
192	LAFYYGMY	РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛплоск, РЯ, РПрЖ, ПКК, РЭМ
193	SQNGQLIHY	РЯ
194	CYTADNEMGY	ГКК
195	YTADNEMGY	НМРЛадено, НМРЛдругие
196	RLAQYTIERY	ГКК
197	NDEIDKLTGY	МЕЛ
198	KLTDYINANY	ГБМ
199	LCAAVLAKY	МЕЛ
200	SLPEFGLTY	ГБМ, ПКК
201	SLPEFGLTYY	РП
202	QTDINGGSLK	МЕЛ
203	LSQDELSKF	НМРЛплоск
204	NVKEAPTEY	НМРЛдругие
205	RMQEGSEVY	МЕЛ
206	RVFVAVTLY	РЯ, РПрЖ
207	LLEGEDAHLTQY	ПлККГШ
208	LLISKAEDY	МЕЛ
209	EADPFLKYL	ОМЛ
210	LLEADPFLKY	ОМЛ
211	YLNEWGSRF	НМРЛадено
212	MMTDLTSVY	МЕЛ
213	VSDSTTEITY	РПЖ
214	VQDPSPVPY	НМРЛплоск
215	DTLEAATSLY	ГКК

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
216	NSMLDPLVY	PMЖ, ПЛККГШ, HMPЛплоск, КМП
217	LMDEGAVLTL	ПЛККГШ
218	FTAQLQLY	РЖП
219	KTELETALYY	ГКК
220	DVERIKDTY	HMPЛплоск
221	TDVERIKDTY	ГКК, HMPЛплоск
222	GSPDAVVS	HMPЛплоск
223	NAVDVVPSSF	РЖП
224	RTDEGDNRVW	РП
226	QITPKHNGLY	HMPЛплоск, РЯ
228	KSFDDIAKY	РЯ
229	MTDVFIDY	HMPЛплоск
230	CVIETFHKY	РЖП
231	LLPLLVMAY	РЯ
232	RYLNIVHATQLY	ХЛЛ
233	RINSATGQY	ХЛЛ
234	YTDLTTIQV	ПЛККГШ
235	SIEIDHTQY	ХГК, МЕЛ, HMPЛадено
236	VLDSELLAQY	РЖ
237	AQEAAVFLTY	МРЛ
238	ETDWGLLKGHTY	PMЖ
239	SSERGSPIEKY	РП
240	EVLDSELLAQY	РП
241	SLMVASLTY	РЯ
242	GTNLPTLLW	ГКК, РП
243	LTSEDGTAY	HMPЛадено
244	VTKYIAGPY	PMЖ
245	LSDNAANRY	ОМЛ
246	ARLEGEIATY	HMPЛплоск
247	SMIRVGTNY	HMPЛплоск, РЯ
248	VTDIDELGK	ГБМ
249	GVGFTELEY	РЖ
250	GYVCNACGLY	ПЛККГШ
251	GIEMTYETY	РЖП
252	DTTSHTYLQY	РП
253	YLESHGLAY	HMPЛплоск
254	FLFNDALLY	PMЖ
255	WELDSLEY	ГБМ
256	HAFESNNFIY	РЖП

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
257	KSEMNVMNMY	PMЖ, PЖП, HMPЛплоск, PПрЖ, PЭМ
258	RPSSVLTII	ГБМ, МЕЛ, HMPЛплоск
259	APDEVVALL	МЕЛ
260	KPTEDSANVY	РП
261	MTEGSTVNTEY	PЖП, PЖ
263	DCMDTEGSYM	PЭМ
264	YRDPVVFVSL	PЯ
266	LTDSFLLRF	ГКК
267	IVADDTVY	HMPЛадено, HMPЛдругие
268	AILHHLYFY	PMЖ
269	LPSPAATIWDY	PЖП
270	DLKIDLAAQY	РП
271	VAEPPVVCSEY	ГКК
272	IPQDECLRY	PЖП, ПлККГШ
273	CGPNEINHFI	HMPЛплоск
274	YADIHGDL	ПКК
275	ESDEMENLLTY	PMЖ
276	QITSFASGTSY	PЖ
277	LPAPGFLFI	PЖП
278	AATVKSDII	HMPЛплоск
279	LMTVLLKY	PMЖ
280	TTEMVSNESVDY	PЖП
281	YPDLSSELLM	ОМЛ, ПКК, PЭМ
282	QAMPSWPTAAY	HMPЛплоск
283	ETILVSSSY	HMPЛадено
284	TCSHTFVYY	HMPЛадено, MPЛ
285	VLPHHSEGACVY	HMPЛадено, PЯ
286	ATDMEGNLNY	PMЖ, ГБМ, HMPЛадено
287	ENSIEDLQY	ГКК
289	YTSHEDIGY	HMPЛадено
290	GQFTGTAGACRY	HMPЛадено, PЯ
291	TSDVTGSLTY	PMЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, HMPЛадено, HMPЛдругие
292	VLDFAAPPASAY	PЯ
293	IISVLIAY	PMЖ
294	MMEMEGMY	HMPЛплоск
295	GQRLDEAMISY	PЯ
296	HMLAAMAY	PMЖ, МЕЛ, НХЛ, HMPЛадено, HMPЛдругие, HMPЛплоск, PЯ, ПКК
297	RLDEAMISY	КМП

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
298	KFDVINHYF	РМЖ
299	EVDSVALSL	МЕЛ
300	VSINPNSGDIY	РЖ
301	ESQTCASDY	РЖП, НМРЛдругие
302	FYLSTPENYHY	РМЖ
303	GFGGLSSQGVYY	ХГК, ПлККГШ
304	FSENLIYTYI	МЕЛ
305	YADLLIYTY	НМРЛадено, КМП
306	KSFETTVRY	МЕЛ, РП
307	DTDDRELRY	ГБМ, ГКК, РЭМ
308	ELAAGQVYY	ХЛЛ, РП
309	EVDRNLIQY	РЭМ
311	TVTDGHTHDFY	НМРЛплоск
312	VTDGINPLI	РП
313	VTDGHTHDFY	МЕЛ
314	PPEANSLQGALY	ХГК, РЯ
315	VLKIELETY	ГБМ, РЖ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, РПрЖ, ПКК
316	YTCEECGQAF	РМЖ, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, РЭМ
317	EDLLEVLDY	РЭМ
318	YMTSMALNY	НМРЛплоск
319	FTDPHIITF	РМЖ
320	QALQDKLQTFY	РМЖ
321	DGIADASNLSYY	МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск
322	FSELNPLALY	РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП
323	KTLQKPVLPY	ХЛЛ
324	RTGIFPYRF	РЖП
325	LQKPVLPY	ХЛЛ, НМРЛплоск
326	STSRLTLFS	ГБМ, ПлККГШ
327	IMLSVDQHLY	ПлККГШ, МЕЛ
328	LLDEDNNIKL	РЖП
329	NTDSMTLNNTAY	РМЖ, РЖП, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, КМП
331	YLYQAPGSLALY	НМРЛадено
332	SLISFKYTSY	РЯ
333	LSDPQAEQLQFY	ГБМ
334	PSSMPECLSY	НМРЛплоск
335	PSSMPECLSY	НМРЛадено
336	ATNIQLNIDTY	РЯ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
337	FTESNQYNIY	РМЖ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск
338	YSPDSFNVSW	РП
339	ESMDIFPLGW	ПлККГШ, РЯ, РП
340	SVDSNLVAY	НМРЛадено
341	PANYLGKMTY	МЕЛ, НМРЛадено, РЯ, РПрЖ
343	YFGNYFTYY	РМЖ
344	AVNALQSVY	ОМЛ, РЖП, ГБМ, РЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, РПрЖ, РЭМ
345	NTMDAVPRIDHY	РЖП, РЖ
346	VAGLEAGVLY	РМЖ, ГБМ, ГКК, МЕЛ, РЯ, КМП, РЭМ
347	SADHPGLTF	КРК
349	HLLSVSLYY	НМРЛплоск
350	LTDPQVSYV	МЕЛ
351	VLDPMLDFY	ГКК
352	YPVVVAESMY	МЕЛ
353	RLNGSVASY	РЯ
355	MADRGEARL	ОМЛ
356	NSENHILKY	РЖ, РП
358	YMSPDIALLY	ГБМ, ГКК, НМРЛадено
359	NKEINYFMY	ХГК
360	RFDDINQEF	ПлККГШ
361	FTAEEGQLY	РМЖ, РЖП, ГБМ, ГКК, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
362	SGALDEAAAY	ГБМ, НМРЛадено, РПрЖ
363	LTDRDVSFY	ГКК
364	DTGYLQLYY	РМЖ
365	FVDTKVPEH	ГКК, НХЛ, НМРЛплоск
366	ITVDVRDEF	ГБМ
367	LTDTGYLQLY	ГБМ, ПлККГШ, РЯ, РП, КМП
368	ESAATGQLDY	РЯ
369	AVMEAAFVY	РМЖ
370	RLSTIRHLY	ПлККГШ, МЕЛ
371	WSDSTSQTIY	РП
372	SRSDFEWVY	РМЖ, РП
373	FHADSDDES F	НХЛ
374	LTSVVVTLW	ГКК
375	ASSLDSLHY	РМЖ
376	EDDEDEDLY	НМРЛплоск
377	YADPSANRDLL	РЯ
378	TAKAPSTEY	РПЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
379	SLIIDDTEY	РЖП, НМРЛплоск
380	VACGNNPVY	НМРЛадено
381	ETSFSTSHY	ПлККГШ
382	YEPATMEQY	НМРЛплоск
383	PPDHAVGRTKY	КМП
384	RFRSITQSY	ХЛЛ
385	SANALILTY	РМЖ, МЕЛ
386	NSALNPLLY	РМЖ, НМРЛадено
387	LMEKEDYHSLY	МЕЛ
388	YTAHVGYSMY	НМРЛадено
389	YYDLVESTF	ОМЛ
390	FSEPFHLIVSY	ХЛЛ, МЕЛ
392	TQHfVQENY	МЕЛ
393	QVWGGQPVY	МЕЛ
394	QVPLDCVLY	ПлККГШ, РП
395	ILKGGSGTY	МЕЛ
396	LPDPNVQKY	МЕЛ
397	NSAINPLIY	НМРЛадено, ПКК, РЭМ
398	YYYDTHNTY	ПлККГШ, РПрЖ

ПРИМЕР 2:

Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

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

Источники и приготовление РНК

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

Суммарная РНК здоровых тканей человека для экспериментов по секвенированию РНК (RNASeq) была получена из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания). Суммарная РНК опухолевых тканей для экспериментов RNASeq была получена из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США), Istituto Nazionale Tumori «Pascale» (Неаполь, Италия), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), 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 эквимольном соотношении и секвенировали на системе компании Illumina HiSeq 2500 согласно инструкциям производителя, получая одноконцевые риды длиной 50 пар оснований. Обработанные риды картируют на человеческий геном (GRCh38) с помощью программного обеспечения STAR. Данные по экспрессии 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 в случае острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, представлены на Фигурах 2. Показатели экспрессии других иллюстративных генов показаны в Таблице 9.

Таблица 9: Показатели экспрессии. В таблице представлены пептиды генов, которые в очень высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или

избыточно экспрессируется в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+). Фоновый уровень данного показателя рассчитывали по измерениям следующих соответствующих нормальных тканей: жировая ткань, ткань надпочечника, желчного протока, клетки крови, кровеносные сосуды, костного мозга, головного мозга, ткань пищевода, глаза, желчного пузыря, сердца, головы и шеи, почки, толстой кишки, печени, легких, лимфатического узла, нерва, паращитовидной железы, поджелудочной железы, гипофиза, плевры, скелетных мышц, кожи, тонкой кишки, селезенки, желудка, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов. ОМЛ: острый миелоидный лейкоз; РМЖ: рак молочной железы; ХГК: холангиоцелочная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГKK: гепатоцелочная карцинома; ПлККГШ: плоскоцелочная карцинома головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено: немелкокцелочный рак легких - аденокарцинома; НМРЛдругие: образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск; НМРЛплоск: плоскоцелочный немелкокцелочный рак легких; РЯ: рак яичника; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РПрЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечноцелочная карцинома; МРЛ: мелкокцелочный рак легких; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак эндометрия и матки.

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
1	TLDSTRTLY		ГБМ	РПрЖ
2	VDPIGHLY	КРК, НХЛ, РЯ, РПЖ	РЖП, НМРЛадено, РЭМ	РЖ, ГKK, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РП, МРЛ, КМП
3	FGTTPAAEYF	НМРЛадено, НМРЛплоск, МРЛ		ПКК
4	RIEAIRAEY			МЕЛ

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
5	FMVIAGMPLFY	НМРЛадено, НМРЛплоск		ПКК
6	ARDPITFSF	РМЖ, КРК, РЯ, МРЛ	НМРЛадено, НМРЛдругие	ОМЛ
7	ASDDVRIEVLGY	РМЖ, КРК, РЯ, МРЛ	НМРЛадено, НМРЛдругие	ОМЛ
8	TSRAANIPGY	РМЖ, ХЛЛ		НХЛ
9	QLDSTLDSY	РЯ		РМЖ
10	VSERTGISY			МЕЛ
11	ASDHWGRGY			РПрЖ
12	YTDVFGEGLY			РПрЖ
13	NTHTGTRPY	РЖП, МЕЛ, НХЛ	РЯ	
14	QSEKEPGQQY	РЖП	ГКК	
15	YLDSSKPAVY		РМЖ, РЯ, РЭМ	
16	NSDISIPEY		РЯ, РЭМ	
17	ASWAVLCYY		РПрЖ	
18	RSDPVSLRY		ГБМ	
19	LTEGHSGNY		ХЛЛ, НХЛ	
20	LSAQHRMLA	ХЛЛ, МРЛ	НХЛ	
21	LSSAVNPIIY	НМРЛплоск, РЭМ	РЖ, РПЖ	
22	VMDTLGLFY	ГКК	РПрЖ	
23	DTDPLKAAGL	РЖП, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛдругие, МРЛ, КМП, РЭМ	КРК, РЖ, РПрЖ	
24	NLDHYTNAY		МРЛ, РЭМ	
25	AMMQEAQLAY	ГБМ	МРЛ	
26	ASDDFRSKY	НМРЛплоск, РП, КМП	ПлККГШ, МЕЛ	
27	PSEVPVDSHY	ХГК	МЕЛ	
28	PSEVPVDSHY	ХГК	МЕЛ	
29	TLEDLDNLYNY	КРК, РЖП, НХЛ, КМП, РЭМ	РМЖ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ	
30	VTTDKPRAY		МЕЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
31	VSDHLQAGMLGQY	НМРЛдругие, РП	ПлККГШ	
32	GTDKQNSTLRY		МЕЛ	
33	SMDPVTGYQY		МЕЛ	
34	SSWSAGENDSY	НХЛ	ПлККГШ, МЕЛ	
35	SWSAGENDSY S	НХЛ	ПлККГШ, МЕЛ	
36	MTSTEQSLY	РМЖ, ГКК, МЕЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ	РПрЖ	
37	MTSTEQSLYY	РМЖ, ГКК, МЕЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ	РПрЖ	
38	KWSQSSSLMY	ХГК	ГКК	
39	WSQSSSLMY	ХГК	ГКК	
40	TSDQLGYSY		МЕЛ	
41	HSDLLEDISKY		РМЖ	
42	ASDVDTLK		ГБМ	
43	ETEPERHLGSY		РПрЖ	
44	IPSFNEMVY		ГБМ	
45	NLDPNKIY	КРК, РЖ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ	РЖП	
46	RSDPGGGGLA YAAY	ГБМ, МРЛ	ОМЛ	
47	WSDGVPLLY		ГБМ	
48	FTTQDELLVY		РПрЖ	
49	GSFSIQHTY		РПрЖ	
50	ITDEDEDMLSY		РЖП, ГКК	
51	STEERRLNY		РПрЖ	
52	TTQDELLVY		РПрЖ	
53	YLEDRLPSQLY		МЕЛ	
54	EVDIHTIHY	РП	ПлККГШ	
55	ATEGDVLNY	НХЛ	ХЛЛ	
56	VTEYAEIYQY	РЯ, РП	ОМЛ, РЭМ	
57	ASDPASSTSCY		НМРЛдругие	
58	YLENSASWY		РЭМ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
59	FTDSQGNDIK		МЕЛ	
60	MTEKFLFLY	РМЖ, ХЛЛ, НХЛ, ПКК	КМП	
61	SSDIVALGGFLY	РМЖ, НМРЛплоск, РП, КМП	ПлККГШ	
62	VSELVTTGHI		ГБМ	
63	TSEISQNALMY	НМРЛдругие, НМРЛплоск	НМРЛадено	
64	TSEISQNALMY Y	НМРЛдругие, НМРЛплоск	НМРЛадено	
65	SSDFDPLVY	ГКК	КРК	
66	IATVIQLFY	ПлККГШ, НМРЛплоск, РП	КМП	
67	NVDQNNQNSY		МЕЛ	
68	QSLPEFGLTY	РЖ, ПлККГШ, РП, КМП	КРК	
69	QSLPEFGLTYY	РЖ, ПлККГШ, РП, КМП	КРК	
70	YTELVEEKY		РЭМ	
71	LTDSTTRTTY		РПЖ	
72	VTDSTTKIAY		РПЖ	
73	STDSASY		ГКК	
74	EMEQQSQEY	РП	ПлККГШ	
75	FTDYELKAY		ГКК	
76	QTDVERIKDTY	ХГК, РЖ, ПлККГШ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, КМП	РП	
77	FTSDTGLEY	ОМЛ		
78	QLDSAVKNLY	КРК, НХЛ		
79	ASDLEPRELLS Y	ГБМ		
80	ELCPLPGTSAY	ГБМ, РЯ, МРЛ		
81	YSDLHTPGRY	МЕЛ, НМРЛадено, МРЛ		
82	LTEKSHIRY	МЕЛ		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
83	DTEFHGGLHY	РЖП, РЖ, РПЖ		
84	ESEMIKFASY	ГКК		
85	SSDNYEHWLY	ХЛЛ		
86	VDPASNTY	РМЖ, КРК, РЖ, РЭМ	ГКК, НМРЛадено	РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, КМП
87	AFDDIATYF	МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено	МРЛ	ГКК
88	KEVDPAGHSYI	КРК, РПЖ	РМЖ, РЖ, ГКК, НХЛ, НМРЛадено, РЯ, РЭМ	РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РП, МРЛ, КМП
89	EVYDGREHSAY	РМЖ, ХГК, РЯ, КМП	РЖП, РЖ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛадено, МРЛ	ГКК, МЕЛ, НМРЛплоск, РП
90	YEDHFPLLF	ГКК, НМРЛадено, РЭМ	РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ	МЕЛ, КМП
91	CLVLVIVLLY	НМРЛадено, НМРЛплоск		ПКК
92	TTDDTTAMASAS	ГКК, РЭМ	РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ	МЕЛ, КМП
93	HLKILSPIY	РМЖ, КРК, НХЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ	НМРЛадено, НМРЛдругие	ОМЛ
94	KPSAVKDSIY	РЯ	РПрЖ, МРЛ	РЭМ
95	SSDPKAVMF	ГКК, ПКК	ХГК, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, РЯ, РПЖ, РЭМ	КРК, РЖП, ПлККГШ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РП, МРЛ, КМП
96	TATLLIVRY	РМЖ, КРК, МРЛ	НМРЛадено, НМРЛдругие	ОМЛ
97	FPAPPAHWFY	РЯ		РМЖ

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
98	NFSDLVFTY	ХЛЛ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, ПКК, КМП	РМЖ, МРЛ	ГБМ
99	AADSNPSEL		РПрЖ	
100	TTSSAISWILY		РМЖ	
101	SITDVDFIY	КРК, МРЛ	РПрЖ	
102	STIRGELFF	ГКК, РЯ, ПКК, МРЛ	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	
103	ITDTLIHLM		РМЖ, РЯ, РЭМ	
104	ITDTLIHL		РМЖ, РЯ, РЭМ	
105	VVFDKSDLAKY		РПрЖ	
106	EVVEGKEWGSFY		КРК, РЖП, РЖ, РПЖ	
107	TTENSGNYY		ХЛЛ, НХЛ	
108	NSNLKFLEV	РМЖ, КРК, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, РП, РПЖ, МРЛ, РЭМ	ПлККГШ, НМРЛплоск, РЯ	
109	ISEDKSISF		МЕЛ	
110	IGDKVDAVY	НМРЛадено, КМП	ПлККГШ, НМРЛплоск, РП	
111	TRIPFDKILY	КРК, НМРЛплоск, РЯ, КМП, РЭМ	РМЖ, ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, РП, РПЖ	
112	KASSVSAEDGY	РМЖ, МРЛ, КМП	РПрЖ	
113	ASCRSSAEY	РЖП, РЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, РПЖ, РЭМ	ХГК, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП, КМП	
114	AVAAAAGASLY		РЭМ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
115	NEIDIHSIYFY	НМРЛдругие, РП	ПлККГШ	
116	RSDIGEFEW	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	ХЛЛ, МРЛ	
117	SPAKQFNIY	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	ХЛЛ, МРЛ	
118	LTWAHSAKY	ХГК	МЕЛ	
119	TVFDENLSRY	НМРЛдругие, РП	ПлККГШ	
120	LVDENQSWY	НМРЛдругие, РП	ПлККГШ	
121	SADEAHGLL	РМЖ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, КМП, РЭМ	ХГК, КРК, РЖП	
122	ISEAPLTEV		МЕЛ	
123	LLKAKDILY		ГКК, РПРЖ	
124	FLKVTGYDKDD Y		МЕЛ	
125	FQYELRELY		МЕЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
126	TTDPKKFQY		МЕЛ	
127	VPFNLITEY	ГКК	МЕЛ	
128	YTEFVDATFTK	РП	ПлККГШ	
129	STIDFRAGF		МЕЛ	
130	YIGLKGLYF	ГКК	МЕЛ	
131	LEDGIEQSAY	ОМЛ	ХЛЛ	
132	RTHIGYKVY		МЕЛ	
133	ITDVGPNGY		МЕЛ	
134	SAPSSSGSPLY	ХЛЛ	МРЛ	
135	TFDKQIVLL	ХГК	ГКК	
136	RRLNFSGFGY		МРЛ	
137	EAYLERIGY		РМЖ	
138	IPVHDSVGVTY		ГБМ	
139	PVHDSVGVTY		ГБМ	
140	SQHIFTVSY		ГБМ	
141	DAVAPGREY	ХГК	ГКК	
142	IEKFAVLY		ГБМ	
143	HVSGQMLYF	РМЖ	РЭМ	
144	RTIEGDFLW		ГБМ	
145	LSDAVHVEF		ХЛЛ, НХЛ	
146	LCATVCGTEQY	РМЖ	ГБМ, МЕЛ	
147	AQVQDTGRY		МЕЛ	
148	GTKQWVHARY		ХЛЛ, НХЛ	
149	PIMSSSQALY		МЕЛ	
150	FTTSLSDLQTNM A	ОМЛ, РЖП, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, РЯ, РП	МЕЛ, МРЛ	
151	YEVDTKLLSL	РЖП, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП	МЕЛ, МРЛ	
152	YLEDRLPSQ		МЕЛ	
153	HSIEVFTHY		МЕЛ	
154	SIEVFTHY		МЕЛ	
155	HTMEVTVY		МЕЛ	
156	STALSILL		ГБМ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
157	GLIEVVTGY		РМЖ	
158	EVTDRNMLAF	РЯ	РМЖ	
159	RQAPGPARDY	НМРЛплоск, КМП	ПлККГШ, РП	
160	EVLGEEMYAY	РМЖ	РПрЖ	
161	EAAPDIMHY	РМЖ, ГКК, МЕЛ, РЯ	РПрЖ	
162	IADNPQLSFY	РПрЖ	РМЖ	
163	KIRAEVLSHY		ХЛЛ	
164	KLAGTVFQY	РМЖ, КРК, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РП, РПЖ, МРЛ, КМП	ХГК, РЖП	
165	VSVYNSYPY		РПрЖ	
166	YHRICELLSDY	РМЖ, РЖП, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ	РПрЖ	
167	RAVQPGETY	ХГК	ГКК	
168	VQPGETYTY	ХГК	ГКК	
169	TVDNANILL	НМРЛплоск, КМП	ПлККГШ, РП	
170	VQIAKGMNY	ПлККГШ	ГБМ	
171	ITDFGLAKL	ПлККГШ	ГБМ	
172	FSEPFHLIV	МЕЛ	ХЛЛ, НХЛ	
173	QSTTGVS HY		ГБМ	
174	TSEVEGLAFVS Y		ГБМ	
175	GLEYEAPKLY		ОМЛ	
176	HTDLESPSAVY		КМП	
177	LVDGKWQEF		КМП	
178	TQRTSFQFY	НМРЛдругие, НМРЛплоск	НМРЛадено	
179	SSTDFTFASW	РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП, КМП	КРК	
180	AQISDTGRY		МЕЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
181	SVTDLIGGKW	ОМЛ, НМРЛплоск, РП	ПлККГШ, КМП	
182	TQPELSSRY	РМЖ, КРК, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РП, РПЖ, КМП	ХГК, РЖП	
183	LADTDLGMTF	ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, МРЛ	РЖП	
184	KTIQEVAGY		ГБМ	
185	NSDESADSEPH KY		НХЛ	
186	AVSSGLFFY	НХЛ	ХЛЛ	
187	TQKSVQVLAY		ГБМ	
188	DIPDYLLQY		НХЛ	
189	FRGVFVHRY	МЕЛ, НМРЛадено, РЯ, МРЛ	РЖП, НХЛ	
190	VSSTVHNLY	РМЖ, РЯ	РПрЖ	
191	FTRAFDQLRM		ХЛЛ	
192	LAFYYGMY	ГБМ, ПлККГШ, НМРЛадено, РП	НМРЛплоск	
193	SQNGQLIH Y		МЕЛ	
194	CYTADNEMGY	НМРЛдругие, НМРЛплоск	НМРЛадено	
195	YTADNEMGY Y	НМРЛдругие, НМРЛплоск	НМРЛадено	
196	RLAQYTIERY	РЖП, РЖ, РЭМ	РПЖ	
197	NDEIDKLTGY		РПрЖ	
198	KLTDYINANY		ГБМ	
199	LCAAVLAKY		ГКК	
200	SLPEFGLTY	РЖ, ПлККГШ, РП, КМП	КРК	
201	SLPEFGLTYY	РЖ, ПлККГШ, РП, КМП	КРК	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
202	QTDINGGSLK		МЕЛ	
203	LSQDELSKF	РМЖ, ХГК, НХЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, КМП, РЭМ	РЖП	
204	NVKEAPTEY	НХЛ	ХЛЛ	
205	RMQEGSEVY	НХЛ	ХЛЛ	
206	RVFVAVTLY		РПрЖ	
207	LLEGEDAHLTQY	НМРЛплоск, КМП	ПлККГШ, РП	
208	LLISKAEDY		РМЖ	
209	EADPFLKYL	РЯ, РП, РЭМ	ОМЛ	
210	LLEADPFLKY	РЯ, РП, РЭМ	ОМЛ	
211	YLNEWGSRF	РЖП, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, КМП	ПлККГШ	
212	MMTDLTSVY		РПЖ	
213	VSDSTTEITY		РПЖ	
214	VQDPSLPVY	ХЛЛ, КРК, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, КМП	НХЛ	
215	DTLEAATSLY	НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ	МРЛ	
216	NSMLDPLVY	КМП	РМЖ	
217	LMDEGAVLTL	ХЛЛ, НХЛ	КРК	
218	FTAQLQLY	НМРЛдругие, НМРЛплоск	НМРЛадено	
219	KTELETALYY	ГБМ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП, РПЖ, ПКК	КРК	
220	DVERIKDTY	ХГК, РЖ, ПлККГШ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, КМП	РП	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
221	TDVERIKDTY	ХГК, РЖ, ПлККГШ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, КМП	РП	
222	GSPDAVVS	ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ		
223	NAVDVVPSSF	РМЖ, ХГК, РЖП, НМРЛплоск, РЯ, РП, КМП, РЭМ		
224	RTDEGDNRVW	РЖП, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, КМП		
225	STDPNIVRK	МЕЛ, РПРЖ, МРЛ		
226	QITPKHNGLY	ХГК, МЕЛ		
227	ESAPKEVSR	ПКК, КМП		
228	KSFDDIAKY	РЖП, ГКК, НХЛ, НМРЛадено, РЯ, РПЖ		
229	MTDVFI	ГКК		
230	CVIETFHKY	ПлККГШ, МЕЛ		
231	LLPLLVMAY	ХЛЛ		
232	RYLNIVHATQLY	ХЛЛ		
233	RINSATGQY	ХЛЛ		
234	YTDLTTIQV	РМЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, РП		
235	SIEIDHTQY	ГКК		
236	VLDSL	РЖП, ГКК, ПлККГШ, НМРЛплоск, МРЛ		
237	AQEAAVFLTY	РПРЖ		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
238	ETDWGLLKGHTY	РЭМ		
239	SSERGSPIEKY	РМЖ		
240	EVLDSELLAQY	РЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, МРЛ		
241	SLMVASLTY	ОМЛ, ХГК, РПЖ, РЭМ		
242	GTNLPTLLW	МРЛ		
243	LTSED TGAY	МРЛ		
244	VTKYIAGPY	ХГК		
245	LSDNAANRY	ОМЛ		
246	ARLEGEIATY	ПлККГШ, РП		
247	SMIRVG TNY	ГБМ, МРЛ		
248	VTDIDELGK	ОМЛ		
249	GVGFT ELEY	ГКК		
250	GYVCNACGLY	РМЖ		
251	GIEMTYETY	РМЖ, ХЛЛ, МРЛ		
252	DTTSHTYLQY	ГБМ		
253	YLESHGLAY	ГБМ, ГКК, МЕЛ, РПЖ, МРЛ		
254	FLFNDALLY	ХГК, РЖП, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ		
255	WELDSLEY	РМЖ, ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, КМП, РЭМ		
256	HAFESNNFIY	ХГК, РЖП, НМРЛадено		
257	KSEMNVNMKY	ХГК, РЖП, НМРЛадено		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
258	RPSSVLTIIY	ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, МРЛ, КМП		
259	APDEVVALL	РМЖ, ХГК, МЕЛ, РЯ, РЭМ		
260	KPTEDSANVY	ГБМ		
261	MTEGSTVNTEY	ХГК, РЖП, МЕЛ, РЯ, ПКК, МРЛ, РЭМ		
262	NVKHFLNDLY	ХГК, РЖП, МЕЛ, РЯ, ПКК, МРЛ, РЭМ		
263	DCMDTEGSYM	ГБМ, НМРЛдругие, РЯ, МРЛ		
264	YRDPV FVSL	КРК		
265	LSDIDSR YI	РМЖ, ХГК, РЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ		
266	LTDSFLLRF	ГКК		
267	IVADDTVY	РПрЖ		
268	AILHHLYFY	РПрЖ		
269	LPSPAATIWDY	КРК, РЖ, НМРЛадено, РПЖ, ПКК		
270	DLKIDLAAQY	ПлККГШ, НМРЛплоск, РП		
271	VAEPPVCSY	РЯ, МРЛ		
272	IPQDECLRY	РМЖ, РЖ, ГКК, МРЛ		
273	CGPNEINH FY	МЕЛ, КМП		
274	YADIHG DLL	РМЖ, ХГК		
275	ESDEMENLLTY	РМЖ, РПрЖ		
276	QITSFASGTSY	ОМЛ		
277	LPAPGFLFY	РМЖ		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
278	AATVKSDIY	РМЖ, НХЛ, РПрЖ, МРЛ		
279	LMTVLLKY	НМРЛдругие		
280	TTEMVSNESVDY	ХГК, РЖП, ПКК		
281	YDDLSELLM	ХГК, РЖП, МЕЛ, НХЛ, НМРЛдругие, РП, МРЛ, КМП		
282	QAMPSWPTAA Y	МЕЛ		
283	ETILVSSSY	ГКК		
284	TCSHTFVYY	ХГК, НМРЛдругие, НМРЛплоск, МРЛ		
285	VLP HHSEGACV Y	РПрЖ		
286	ATDMEGNLNY	ГБМ		
287	ENSIEDLQY	РМЖ, РПрЖ, РЭМ		
288	TEEFVSY	КРК, РЖЖ, МРЛ		
289	YTS HEDIGY	НМРЛдругие		
290	GQFTGTAGACRY	РЯ		
291	TSDVTGSLTY	РМЖ, ХГК, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, ПКК		
292	VLDFA PP GASA Y	РЯ		
293	IISVLIAIY	МРЛ		
294	MMEME GMY	РПрЖ		
295	GQRLDEAMISY	РЯ, КМП		
296	HMLAAMAY	РЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, КМП		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
297	RLDEAMISY	РЯ, КМП		
298	KFDVINHYF	РЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, КМП		
299	EVDSVALSL	РЖ, НХЛ, РПЖ		
300	VSINPNSGDIY	ГБМ, РЯ, РЭМ		
301	ESQTCASDY	ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП, КМП, РЭМ		
302	FYLSTPENYHY	МЕЛ		
303	GFGGLSSQGVYY	РЖ		
304	FSENLITYI	МРЛ		
305	YADLLITYY	ПлККГШ, РЯ, КМП, РЭМ		
306	KSFETTVRY	МЕЛ		
307	DTDDRELRY	ГБМ, МРЛ		
308	ELAAGQVVY	ГБМ, МРЛ		
309	EVDRNLIQY	ГБМ, МРЛ		
310	KAFQELGVRY	ГБМ, МРЛ		
311	TVTDGHTDFY	ГБМ, МРЛ		
312	VTDGINPLI	ГБМ, МРЛ		
313	VTDGHTDFY	ГБМ, МРЛ		
314	PPEANSLQGALY	ГБМ		
315	VLKIELETY	РЯ, РЭМ		
316	YTCEECGQAF	ХЛЛ		
317	EDLLEVLDMY	МРЛ		
318	YMTSMALNY	ОМЛ		
319	FTDPHIITF	ХГК, НМРЛдругие, НМРЛплоск, МРЛ		
320	QALQDKLQTFY	ХГК, МРЛ		
321	DGIADASNLSY	РЖП, РЖ, РПЖ		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
322	FSELNPLALY	РМЖ, ПлККГШ, РЯ, РП, КМП		
323	KTLQKPVLPLY	ХЛЛ		
324	RTGIFPYRF	ХЛЛ		
325	LQKPVLPLY	ХЛЛ		
326	STSRLTLFS	РПрЖ		
327	IMLSVDQHLY	ХГК		
328	LLDEDNNIKL	КРК, МРЛ		
329	NTDSMTLNNTAY	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, МЕЛ, НХЛ		
330	EGELSEGEHWY	РПрЖ		
331	YLYQAPGSLALY	РМЖ, РЖ		
332	SLISFKYTSY	МРЛ		
333	LSDPQAELQFY	ГБМ		
334	PSSMPECLSY	КРК, НХЛ		
335	PSSMPECLSYY	КРК, НХЛ		
336	ATNIQLNIDTY	РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, ПКК		
337	FTESNQYNIY	КМП		
338	YSPDSFNVSWS	МЕЛ, РЯ		
339	ESMDIFPLGW	ХЛЛ		
340	SVDSNLVAY	РПрЖ		
341	PANYLGKMTY	РПрЖ		
342	QTYMDGLLHY	ПлККГШ, РП		
343	YFGNYFTYY	НМРЛдругие, МРЛ		
344	AVNALQSVY	КРК, РПрЖ		
345	NTMDAVPRIDHY	КРК		
346	VAGLEAGVLY	МРЛ		
347	SADHPGLTF	ГБМ		
348	DSTDGCLLSF	МЕЛ		
349	HLLSVSLYY	ГКК		
350	LTDPQVSYV	МЕЛ		
351	VLDPMLDFY	РЯ, РЭМ		
352	YPVVVAESMY	РЯ, РЭМ		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
353	RLNGSVASY	РЯ, РЭМ		
354	EIIRYIFAY	ОМЛ		
355	MADRGEARL	РЖП, НХЛ		
356	NSENHILKY	ПлККГШ, МРЛ		
357	MSPDIALLYL	НМРЛдругие		
358	YMSPDIALLY	НМРЛдругие		
359	NKEINYFMY	ГКК		
360	RFDDINQEF	ПлККГШ, РП		
361	FTAEEGQLY	ГКК, РПрЖ		
362	SGALDEAAAY	ГКК, РПрЖ		
363	LTDRDVSFY	ГКК		
364	DTGYLQLYY	ПлККГШ, РЯ, РП, КМП		
365	FVDTKVPEH	РМЖ		
366	ITVDVRDEF	ПлККГШ, РЯ, РП, КМП		
367	LTDTGYLQLY	ПлККГШ, РЯ, РП, КМП		
368	ESAATGQLDY	ГБМ		
369	AVMEAAFVY	РПрЖ		
370	RLSTIRHLY	РМЖ, РЖП, РЖ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ		
371	WSDSTSQTIY	ПлККГШ		
372	SRSDFEWVY	РМЖ, РЖ, КМП		
373	FHADSDDES F	КРК		
374	LTSVVVTLW	ОМЛ		
375	ASSLDSLHY	РМЖ		
376	EDDEDEDLY	ХЛЛ		
377	YADPSANRDLL	ГБМ		
378	TAKAPSTEY	КРК, РЖ, НМРЛадено, РПЖ		
379	SLIIDDTEY	РЖ, РПЖ, КМП, РЭМ		
380	VACGNNPVY	РЖ, РПЖ, КМП, РЭМ		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
381	ETSFSTSHY	ПлККГШ, РП		
382	YEPATMEQY	МЕЛ		
383	PPDHAVGRTKY	РПрЖ		
384	RFRSITQSY	РМЖ, ХЛЛ		
385	SANALILTY	РМЖ, ХЛЛ		
386	NSALNPLLY	НМРЛадено, РЭМ	ПКК	
387	LMEKEDYHSLY		МЕЛ	
388	YTAHVGYSMY		РЭМ	
389	YYDLVESTF		ОМЛ	
390	FSEPFHLIVSY	МЕЛ	ХЛЛ, НХЛ	
391	GSNPARYEF	РМЖ, КРК, РЖ, РЭМ	ГКК, НМРЛадено	РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, КМП
392	TQHfVQENY	КРК, НХЛ, РПЖ	РЖП, НМРЛадено, РЭМ	РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РП, МРЛ, КМП
393	QVWGGQPvY		МЕЛ	
394	QVPLDCVLY		МЕЛ	
395	ILKGGSGTY		МЕЛ	
396	LPDPNVQKY	НХЛ		
397	NSAINPLIY	КРК, РЖП, РЖ		
398	YYYDTHNTY	КРК		

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+ 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*01 пептидов TUMAP по

изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8+ Т-клетки-предшественники (Таблицы 10).

Прайминг CD8+ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (pMHC) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8+ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы информированного согласия) из Университетской клиники г. Мангейм, Германия.

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

Получение микросфер, покрытых pMHC и антителами к CD28, стимуляции Т-клеток и считывание производили на хорошо исследованной системе *in vitro*, используя четыре различные молекулы pMHC для каждого цикла стимуляций и 8 различных молекул pMHC 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. 433) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5, SEQ ID NO. 434), 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 1×10^6 CD8+ Т-клеток с 2×10^5 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 четырех 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*

Проводили исследования иммуногенности *in vitro* пептидов острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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 двух пептидов по изобретению показаны на Фиг. 2 и 3 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 13 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 10а, а результаты для других 28 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 10б.

Таблица 10а: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению

Типичные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для пептидов по изобретению.

<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
399	YVGKEHMFY	+
400	NTDNNLAVY	+
401	VWSNVTPPKF	+
403	SADDIRGIQSLY	+
404	FVDNQYWRV	+
408	VWSDVTPLTF	+
414	LTEGHSGNYY	+
415	VWSDVTPLNF	+
417	KLDRSVFTAY	++++
420	VTDLEMPHY	+
421	RSDPGGGGLAY	+
427	LTDYINANY	+
429	VSDSECLSRV	++

Таблица 10б: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению

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

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
10	VSERTGISY	+
11	ASDHWRGRY	+++
12	YTDFVGEGLY	+
18	RSDPVSLRY	++
19	LTEGHSGNY	+
24	NLDHYTNAY	+
26	ASDDFRSKY	++
27	PSEVPVDSHY	+
33	SMDPVTGYQY	+
37	MTSTEQSLYY	+
42	ASDVDTLK	+
53	YLEDRLPSQLY	+
54	EVDIHTIHY	+
60	MTEKFLFLY	+
61	SSDIVALGGFLY	++
64	TSEISQNALMY	+

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
70	YTELVEEKY	+
71	LTDSTTRTTY	+
73	STDSASY	+
75	FTDYELKAY	+
77	FTSDTGLEY	+++
79	ASDLEPRELLSY	+
81	YSDLHTPGRY	+
82	LTEKSHIRY	+
83	DTEFHGGLHY	+
84	ESEMIKFASY	+
386	NSALNPLLY	+
387	LMEKEDYHSLY	+

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 блокирующем буфере с 2% БСА. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*02:01/MLA-001 служили в качестве стандарта, покрывающего диапазон 15-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-МНС после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл пероксидазы хрена, конъюгированной с антителом к $\beta 2m$, снова промывали и проводили обнаружение с помощью раствора ТМБ; реакцию останавливали NH_2SO_4 . Величину поглощения измеряли при длине волны 450 нм. Пептиды-кандидаты, которые демонстрировали высокий выход реакции обмена (предпочтительно более 50%, наиболее предпочтительно, более 75%) обычно являются предпочтительными для генерирования и получения антител или их фрагментов и/или Т-клеточных рецепторов или их фрагментов, поскольку они проявляют достаточную авидность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

Результаты связывания для 391 пептидов по изобретению с молекулами МНС обобщаются в Таблице 11.

Таблица 11: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*01:01 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; >75% = ++++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
1	TLDSTRTLY	++++
2	VDPIGHLY	++
3	FGTTPAAEYF	++
4	RIEAIRAEY	++
5	FMVIAGMPLFY	+++
6	ARDPITFSF	++
7	ASDDVRIEVGLY	++++
8	TSRAANIPGY	+
9	QLDSTLDSY	+++
10	VSERTGISY	+++
11	ASDHWGRGY	+++
12	YTDFVGEGLY	+++
13	NTHTGTRPY	++
14	QSEKEPGQQY	+++
15	YLDSSKPAVY	+++
16	NSDISIPEY	+++
17	ASWAVLCYY	+++
18	RSDPVSLRY	++++
19	LTEGHSGNY	++++
20	LSAQHRMLA	++
21	LSSAVNPIIY	++
22	VMDTLGLFY	++++
23	DTDPLKAAGL	+
24	NLDHYTNAY	+++
25	AMMQEAQLAY	+++
26	ASDDFRSKY	+++
27	PSEVPVDSHY	++++
28	PSEVPVDSHYY	+++
29	TLEDLDNLYNY	+++
30	VTTDKPRAY	++
31	VSDHLQAGMLGQY	+++
32	GTDKQNSTLRY	+++
33	SMDPVTGYQY	+++
34	SSWSAGENDSY	+++
35	SWSAGENDSYS	+
36	MTSTEQSLY	+++
37	MTSTEQSLYY	+++
38	KSWSQSSSLMY	+++
39	WSQSSSLMY	++++
40	TSDQLGYSY	+++
41	HSDLLEDISKY	+++
42	ASDVDTLK	+++
43	ETEPERHLGSY	+++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
44	IPSFNEMVY	++
45	NLDPNKIY	+
46	RSDPGGGGLAYAAAY	++++
47	WSDGVPLLY	++++
48	FTTQDELLVY	+++
49	GSFSIQHTY	++
50	ITDEDEDMLSY	+++
51	STEERRLNY	+++
52	TTQDELLVY	+++
53	YLEDRLSQLY	++++
54	EVDIHTIHY	+++
55	ATEGDVLNY	+++
56	VTEYAEIYQY	+++
57	ASDPASSTSCY	+++
58	YLENSASWY	++++
59	FTDSQGNDIK	+++
60	MTEKFLFLY	++++
61	SSDIVALGGFLY	+++
62	VSELVTTGHY	+++
63	TSEISQNALMY	++++
64	TSEISQNALMY	+++
65	SSDFDPLVY	++++
67	NVDQNNQNSY	+++
68	QSLPEFGLTY	++
69	QSLPEFGLTYY	++
70	YTELVEEKY	+++
71	LTDSTTRTTY	+++
72	VTDSSTTKIAY	+++
73	STDSASY	++++
74	EMEQQSQEY	++++
75	FTDYELKAY	++++
76	QTDVERIKDTY	+++
77	FTSDTGLEY	++++
78	QLDSAVKNLY	+++
79	ASDLEPRELLSY	+++
80	ELCPLPGTSAY	++
81	YSDLHTPGRY	+++
82	LTEKSHIRY	+++
83	DTEFHGGLHY	+++
84	ESEMIKFASY	++++
85	SSDNYEHWLY	++++
86	VDPASNTY	++
87	AFDDIATYF	++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
88	KEVDPAGHSYI	++
89	EVYDGREHSAY	++
90	YEDHFPLLF	++
92	TTDDTTAMASAS	++
93	HLKILSPIY	+++
94	KPSAVKDSIY	++
95	SSDPKAVMF	++
97	FPAPPAHWFY	++
98	NFSDLVFTY	++
99	AADSNPSEL	++
100	TTSSAISWILY	+++
101	SITDVDFIY	++
102	STIRGELFF	++
103	ITDTLIHLM	+++
104	ITDTLIHL	++
105	VVFDKSDLAKY	++
106	EVVEGKEWGSFY	+++
107	TTENSGNYY	++++
108	NSNLKFLEV	++
109	ISEDKSISF	++
110	IGDKVDAVY	++
111	TPIPFDKILY	++
112	KASSVSAEDGY	++
113	ASCRSSAEY	++++
114	AVAAAAGASLY	++
115	NEIDIHSIYFY	++
116	RSDIGEFEW	++
117	SPAKQFNIY	+++
118	LTWAHSAKY	+++
119	TVFDENLSRY	++
120	LVDENQSWY	+++
121	SADEAHGLL	++
122	ISEAPLTEV	++
123	LLKAKDILY	++
124	FLKVTGYDKDDY	++
125	FQYELRELY	++++
126	TTDPKKFQY	++++
127	VPFNLITEY	+
128	YTEFVDATFTK	++++
129	STIDFRAGF	++
130	YIGLKGLYF	++
131	LEDGIEQSAY	++
132	RTHIGYKVY	+++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
133	ITDVGPGRNY	+++
134	SAPSSSGSPLY	++
135	TFDKQIVLL	++
136	RRLNFSGFGY	+++
137	EAYLERIGY	+++
138	IPVHDSVGVTY	+++
139	PVHDSVGVTY	++
140	SQHIFTVSY	++
141	DAVAPGREY	++
142	IEKFAVLY	+++
143	HVSGQMLYF	++
144	RTIEGDFLW	++
145	LSDAVHVEF	+++
146	LCATVCGTEQY	++
147	AQVQDTGRY	+++
148	GTKQWWHARY	+
149	PIMSSSQALY	++
150	FTTLSDLQTNMA	++
151	YEVDTKLLSL	++
152	YLEDRLPSQ	++
153	HSIEVFTHY	++
154	SIEVFTHY	+++
155	HTMEVTVY	+++
156	STALSILL	++
157	GLIEVVTGY	++++
158	EVTDRNMLAF	+++
159	RQAPGPARDY	++
160	EVLGEEMYAY	++
161	EAAPDIMHY	++
162	IADNPQLSFY	++++
163	KIRAEVLSHY	++
164	KLAGTVFQY	++
165	VSVYNSYPY	++
166	YHRICELLSDY	++++
167	RAVQPGETY	+++
168	VQPGETYTY	+++
169	TVDNANILL	++
170	VQIAKGMNY	+++
171	ITDFGLAKL	++
172	FSEPFHLIV	+++
173	QSTTGVSXY	+++
174	TSEVEGLAFVSY	+++
175	GLEYEAPKLY	++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
176	HTDLESPSAVY	+++
177	LVDGKWQEF	++
178	TQRTSFQFY	++
179	SSTDFTFASW	+
180	AQISDTGRY	++
181	SVTDLIGGKW	++
182	TQPELSSRY	++
183	LADTDLGMTF	++
184	KTIQEVAGY	++
185	NSDESADSEPHKY	++++
186	AVSSGLFFY	++
187	TQKSVQVLAY	++
188	DIPDYLLQY	+++
189	FRGVFVHRY	++
190	VSSTVHNLY	++++
191	FTRAFDQLRM	+++
192	LAFYYGMY	++
193	SQNGQLIHY	+++
194	CYTADNEMGY	+++
195	YTADNEMGY	+++
196	RLAQYTIERY	++
197	NDEIDKLTGY	++++
198	KLTDYINANY	++
199	LCAAVLAKY	++
200	SLPEFGLTY	++
201	SLPEFGLTYY	++
202	QTDINGGSLK	+++
203	LSQDELSKF	++
204	NVKEAPTEY	++
205	RMQEGSEVY	++
207	LLEGEDAHLTQY	+++
208	LLISKAEDY	++
209	EADPFLKYL	++
210	LLEADPFLKY	++++
211	YLNEWGSRF	++
212	MMTDLTSVY	+++
213	VSDSTTEITY	+++
214	VQDPSLPVY	++
215	DTLEAATSLY	++
216	NSMLDPLVY	++++
217	LMDEGAVLTL	++
218	FTAQLQLY	+++
219	KTELETALYY	+++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
220	DVERIKDTY	++
221	TDVERIKDTY	+++
222	GSPDAVVS	+
223	NAVDVVPSSF	+
224	RTDEGDNRVW	++
225	STDPNIVRK	+++
226	QITPKHNGLY	++
227	ESAPKEVSRY	++
228	KSFDDIAKY	++
229	MTDVFIDY	+++
230	CVIETFHKY	+++
231	LLPLLVMAY	++
232	RYLNIVHATQLY	++
233	RINSATGQY	++
234	YTDLTITQV	++++
235	SIEIDHTQY	++
236	VLDSELLAQY	++++
237	AQEAAVFLTY	+++
238	ETDWGLLKGHTY	++++
239	SSERGSPIEKY	+++
240	EVLDSELLAQY	++
241	SLMVASLTY	++
242	GTNLPTLLW	+
243	LTSED TGAY	+++
244	VTKYIAGPY	++
245	LSDNAANRY	+++
246	ARLEGEIATY	++
247	SMIRVGTNY	++
248	VTDIDELGK	+++
249	GVGFTELEY	+++
250	GYVCNACGLY	++
251	GIEMTYETY	++
252	DTTSHTYLQY	++
253	YLESHGLAY	++++
254	FLFNDALLY	++++
255	WELDSLEY	++
256	HAFESNNFIY	++
257	KSEMNVNMKY	++++
258	RPSSVLTIIY	+++
259	APDEVVALL	++
260	KPTEDSANVY	+++
261	MTEGSTVNTEY	++++
262	NVKHFLNDLY	+++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
263	DCMDTEGSYM	++
264	YRDPV FVSL	++
265	LSDIDSR YI	++
266	LTDSFLLRF	++++
267	IVADDTVY	+++
268	AILHHLYFY	+
269	LPSPAATIWDY	+++
270	DLKIDLAAQY	++
271	VAEPPV VCSY	++
272	IPQDECLRY	+++
273	CGPNEINH FY	++
274	YADIHGDLL	+++
275	ESDEMENLLTY	+++
276	QITSFASGT SY	+++
277	LPAPGFLFY	++
278	AATVKSDIY	++
279	LMTVLLKY	+++
280	TTEMVSNESVDY	++++
281	YPDLSELLM	++
282	QAMPSWPTAAY	++
283	ETILVSSSY	++
284	TCSHTFVYY	++
285	VLP HHSEGACVY	+++
286	ATDMEGNLNY	+++
287	ENSIEDLQY	+++
288	TEEFVSY	+
289	YTSHEDIGY	++++
290	GQFTGTAGACRY	++
291	TSDVTGSLTY	++++
292	VLDFA PP GASAY	++++
294	MMEMEGMY	+++
295	GQRLDEAMISY	+++
296	HMLAAMAY	++
297	RLDEAMISY	+++
298	KFDVINHYF	++
299	EVDSVALSL	++
300	VSINPNSGDIY	+++
301	ESQTCASDY	+++
302	FYLSTPENYHY	+++
303	GFGGLSSQGVYY	+++
304	FSENLIYTYI	++
305	YADLLIYTY	++++
306	KSFETTVRY	++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
307	DTDDRELRY	+++
308	ELAAGQVVY	+
309	EVDRNLIQY	+++
310	KAFQELGVRY	++
311	TVTDGTHTDFY	++
312	VTDGINPLI	++
313	VTDGTHTDFY	+++
314	PPEANSLQGALY	++
315	VLKIELETY	+++
316	YTCEECCQAF	++
317	EDLLEVLDMY	++
318	YMTSMALNY	+++
319	FTDPHIITF	++++
320	QALQDKLQTFY	++
321	DGIADASNLSYY	++
322	FSELNPLALY	++++
323	KTLQKPVLPY	++
324	RTGIFPYRF	++
325	LQKPVLPY	++
326	STSRLTLFS	++
327	IMLSVDQHLY	+++
328	LLDEDNNIKL	++
329	NTDSMTLNNTAY	++++
330	EGELSEGEHWY	+++
331	YLYQAPGSLALY	++++
333	LSDPQAELQFY	++++
334	PSSMPECLSY	++++
335	PSSMPECLSYY	+++
336	ATNIQLNIDTY	+++
337	FTESNQYNIY	++++
338	YSPDSFNVSF	++
339	ESMDIFPLGW	++
340	SVDSNLVAY	+++
341	PANYLGKMTY	+++
342	QTYMDGLLHY	++++
343	YFGNYFTYY	+
344	AVNALQSVY	++
345	NTMDAVPRIDHY	++++
346	VAGLEAGVLY	++
347	SADHPGLTF	++
348	DSTDGCLLSF	++
349	HLLSVSLYY	+
350	LTDPQVSYV	+++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
351	VLDPMLDFY	++++
352	YPVVVAESMY	++
353	RLNGSVASY	++
354	EIIRYIFAY	++
355	MADRGEARL	++
356	NSENHILKY	++++
357	MSPDIALLYL	+++
358	YMSPDIALLY	++++
359	NKEINYFMY	+++
360	RFDDINQEF	+
361	FTAEEGQLY	+++
362	SGALDEAAAY	++
363	LTDRDVSFY	++++
364	DTGYLQLYY	++++
365	FVDTKVPEH	++
366	ITVDVRDEF	+
367	LTDGTGYLQLY	++++
368	ESAATGQLDY	+++
369	AVMEAAFVY	+++
370	RLSTIRHLY	+++
371	WSDSTSQTIY	++++
372	SRSDFEWVY	++
373	FHADSDDES F	+
375	ASSLDSLHY	++++
376	EDDEDEDLY	+++
377	YADPSANRDLL	++
378	TAKAPSTEY	++
379	SLIIDDTEY	++
380	VACGNNPVY	+++
381	ETSFSTSHY	++++
382	YEPATMEQY	++
383	PPDHAVGR TKY	++
384	RFRSITQSYY	+
385	SANALILTY	++
386	NSALNPLLY	++++
387	LMEKEDYHSLY	+++
388	YTAHVGYSMY	++++
389	YYDLVESTF	+
390	FSEPFHLIVSY	++++
391	GSNPARYEF	++
392	TQHFVQENY	++
393	QVWGGQPVY	+
394	QVPLDCVLY	++

SEQID	Последовательность	Пептидный обмен
395	ILKGGSGTY	++
396	LPDPNVQKY	++
397	NSAINPLIY	++++
398	YYYDTHNTY	+

Список цитируемой литературы

- Alcoser, S. Y. et al., BMC Biotechnol. **11** (2011): 124
- Allison, J. P. et al., Science. **270** (1995): 932-933
- 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
- Banchereau, J. et al., Cell. **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., J Immunol. **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., Nature. **275** (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological),. **Vol.57** (1995): 289-300
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng. **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., Nature.(2013)
- Bray, F. et al., Int J Cancer. **132** (2013): 1133-1145
- Brossart, P. et al., Blood. **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., Curr Pharm Biotechnol. **5** (2004): 29-43
- Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 345-357
- Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., J Immunol. **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science.(1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003): 2197-2207
- Falk, K. et al., Nature. **351** (1991): 290-296

- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No 11 [Internet] (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Follenzi, A. et al., Nat Genet. **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **98** (2001): 8809-8814
- Forsey, R. W. et al., Biotechnol Lett. **31** (2009): 819-823
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. **2** (1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., Nat Rev Immunol. **6** (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., Int Immunol. **9** (1997): 905-911
- Gragert, L. et al., Hum Immunol. **74** (2013): 1313-1320
- Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual. **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual. **2nd** (2014)
- Gunawardana, C. et al., Br J Haematol. **142** (2008): 606-609
- Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **84** (1987): 4611-4615
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients. **rd** (2000)
- Krieg, A. M., Nat Rev Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Kuball, J. et al., Blood. **109** (2007): 2331-2338
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp Med. **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., Ann N Y Acad Sci. **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat Genet. **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification. **3rd** (2004)
- Meziere, C. et al., J Immunol. **159** (1997): 3230-3237
- Molina, J. R. et al., Mayo Clin Proc. **83** (2008): 584-594
- Morgan, R. A. et al., Science. **314** (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., J Proteome Res. **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480

- Mumberg, D. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **96** (1999): 8633-8638
- Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRANR-projectorg/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., Eur J Immunol. **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., Virology. **202** (1994): 949-955
- Rammensee, H. et al., Immunogenetics. **50** (1999): 213-219
- Rini, B. I. et al., Cancer. **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., Science. **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132
- Saiki, R. K. et al., Science. **239** (1988): 487-491
- Schmitt, T. M. et al., Hum Gene Ther. **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. **119** (2006): 135-145
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics. **49** (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics.(1986)
- Silva, L. P. et al., Anal Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., BMC Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **23** (2014): 1985-1996
- Tran, T. T. et al., Photochem Photobiol. **90** (2014): 1136-1143
- Walter, S. et al., J Immunol. **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423
- World Cancer Report (2014)
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zufferey, R. et al., J Virol. **73** (1999): 2886-2892

Формула изобретения

1. Пептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65, или SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 64, или SEQ ID NO: 66 по 398, или его фармацевтически приемлемая соль, где указанный пептид имеет длину до 16 аминокислот.
2. Пептид в соответствии с 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 в соответствии с любым из пп. 1 или 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: 65, или SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 64, или SEQ ID NO: 66 по 398.
4. Пептид или его соль в соответствии с любым из пп. 1–3, где указанный пептид включает непептидные связи.
5. Антитело, растворимое или связанное с мембраной или моноклональное антитело или его фрагмент, которое специфически распознает пептид или его соль в соответствии с любым из пп. 1–4, или пептид или его соль в соответствии с любым из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.
6. Т-клеточный рецептор, растворимый или связанный с мембраной, или его фрагмент, который реагирует с HLA-лигандом, причем указанный лиганд является пептидом или его солью в соответствии с любым из пп. 1–4, или пептидом или его солью в соответствии с любым из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.
7. Т-клеточный рецептор в соответствии с п. 6, где указанный Т-клеточный рецептор представлен в виде растворимой молекулы и обладает дополнительной эффекторной функцией, например, несет иммуностимулирующий домен или токсин.

8. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая пептид в соответствии с любым из пп. 1–4, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 5, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 6 или п. 7.

9. Рекомбинантная клетка-хозяин в соответствии с п. 8, где указанная клетка-хозяин выбрана из антигенпрезентирующей клетки, такой как дендритная клетка, Т-клетки или NK-клетки.

10. 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, на период времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом в соответствии с любым из пп. 1–3.

11. Активированный Т-лимфоцит, полученный с помощью способа в соответствии с п. 10, который селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в любом из пп. 1–3.

12. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 5, Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 6 или п. 7, клетки-хозяина в соответствии с п. 8 или 9, или активированного Т-лимфоцита в соответствии с п. 11, и фармацевтически приемлемый носитель, и/или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

13. Фармацевтическая композиция в соответствии с п.12, дополнительно включающая количество адъюванта, усиливающее иммуногенность.

14. Фармацевтическая композиция в соответствии с п.12, включающая активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 11 и дополнительно включающая один или более адъювантов, выбранных и интерлейкина и иммуноадъюванта.

15. Фармацевтическая композиция в соответствии с п.14, где а) интерлейкин представляет собой ИЛ-2; и/или б) иммуноадъювант представляет собой ИЛ-15.

16. Способ получения пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 5 или Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 6 или п. 7, причем способ включает культивирование клетки-хозяина в соответствии с п. 8 или 9 и выделение пептида, антитела или его фрагмента или Т-клеточного рецептора или его фрагмента из указанной клетки-хозяина и/или ее культуральной среды.

17. Применение пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 5, Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 6 или п. 7, клетки-хозяина в соответствии с п. 8 или 9 или активированного Т-лимфоцита в соответствии с п. 11 в медицине или в качестве лекарственного средства.

18. Способ уничтожения раковых клеток-мишеней у пациента, у которого раковые клетки-мишени презентируют полипептид, в соответствии с любым из пп. 1–3, где способ включает введение пациенту эффективного числа активированных Т-клеток, как определено в п. 11.

19. Применение пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 5, Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 6 или п. 7, клетки-хозяина в соответствии с п. 8 или 9 или активированного Т-лимфоцита в соответствии с п. 11 в диагностике и/или лечении рака или в производстве лекарственного средства против рака.

20. Применение в соответствии с п. 19, где указанный рак выбран из группы: острый миелоидный лейкоз, рак молочной железы, холангиокарцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак желчного пузыря, глиобластома, рак желудка, гепатокарцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, неходжкинская лимфома, рак легких (в том числе немелкоклеточный рак легких-аденокарцинома, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак яичника, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, карцинома мочевого пузыря, рак матки и эндометрия и

других опухолей, которые демонстрируют избыточную презентацию пептида, состоящего из SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 64, или SEQ ID NO: 66 по 398.

21. Способ получения персонализированной противораковой вакцины или терапевтического средства на основе соединений и/или клеток для отдельного пациента, где указанный способ включает:

- а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентируемых 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) производство и/или 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: 65, или SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 64, или SEQ ID NO: 66 по 398.

22. Способ в соответствии с п. 21, 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 аберрантно; 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 аберрантно экспрессируемых опухолью.

23. Способ в соответствии с п. 21 или п. 22, где последовательности лигандов МНС идентифицируют с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов.

24. Способ в соответствии с любым из пп. 21–23, где нормальную ткань, соответствующую типу ткани опухолевого образца, получают у одного и того же пациента.

25. Способ в соответствии с любым из пп. 21–24, 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, которые кодируются генами, экспрессируемыми селективно или в избытке, как было обнаружено на этапе аа, 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 HLA-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 HLA-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.

26. Способ в соответствии с любым из пп. 21–25, 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.

27. Способ в соответствии с любым из пп. 21–26, 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.

28. Способ в соответствии с п. 27, где указанную по меньшей мере одну мутацию идентифицируют методом полногеномного секвенирования.

29. Способ лечения пациента, больного раком, включающий введение указанному пациенту композицию, включающую популяцию активированных Т-клеток, которые уничтожают раковые клетки у пациента, экспрессирующие пептид по любому из пп. 1–4, где указанный рак выбран из следующего: острый миелоидный лейкоз, рак молочной железы, холангиоклеточная карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак желчного пузыря, глиобластома, рак желудка, гепатоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легких-аденокарцинома, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак яичника, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, карцинома мочевого пузыря, рак матки и эндометрия.

30. Способ вызывания иммунного ответа у пациента, больного раком, включающий введение указанному пациенту композиции, включающей популяцию активированных Т-клеток, которые уничтожают раковые клетки у пациента, экспрессирующие пептид по любому из пп. 1–4, где указанный рак выбран из следующего: острый миелоидный лейкоз, рак молочной железы, холангиоклеточная карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз,

колоректальный рак, рак желчного пузыря, глиобластома, рак желудка, гепатоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, неходжкинская лимфома, рак легких, рак яичника, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, карцинома мочевого пузыря, рак матки и эндометрия.

31. Способ по п. 29 или 30, в котором Т-клетки являются аутологичными по отношению к пациенту.

32. Способ по п. 29 или 30, в котором Т-клетки получены у здорового донора.

33. Способ по п. 29 или 30, в котором Т-клетки получены из опухолеинфильтрующих лимфоцитов или мононуклеарных клеток периферической крови.

34. Способ по любому из пп. 29-30, где активированные Т-клетки получены с помощью контактирования Т-клеток *in vitro* с антигенпрезентирующей клеткой, которая экспрессирует пептид в комплексе с молекулой МНС I класса на поверхности антигенпрезентирующей клетки в течение периода времени, достаточного для активации указанной Т-клетки.

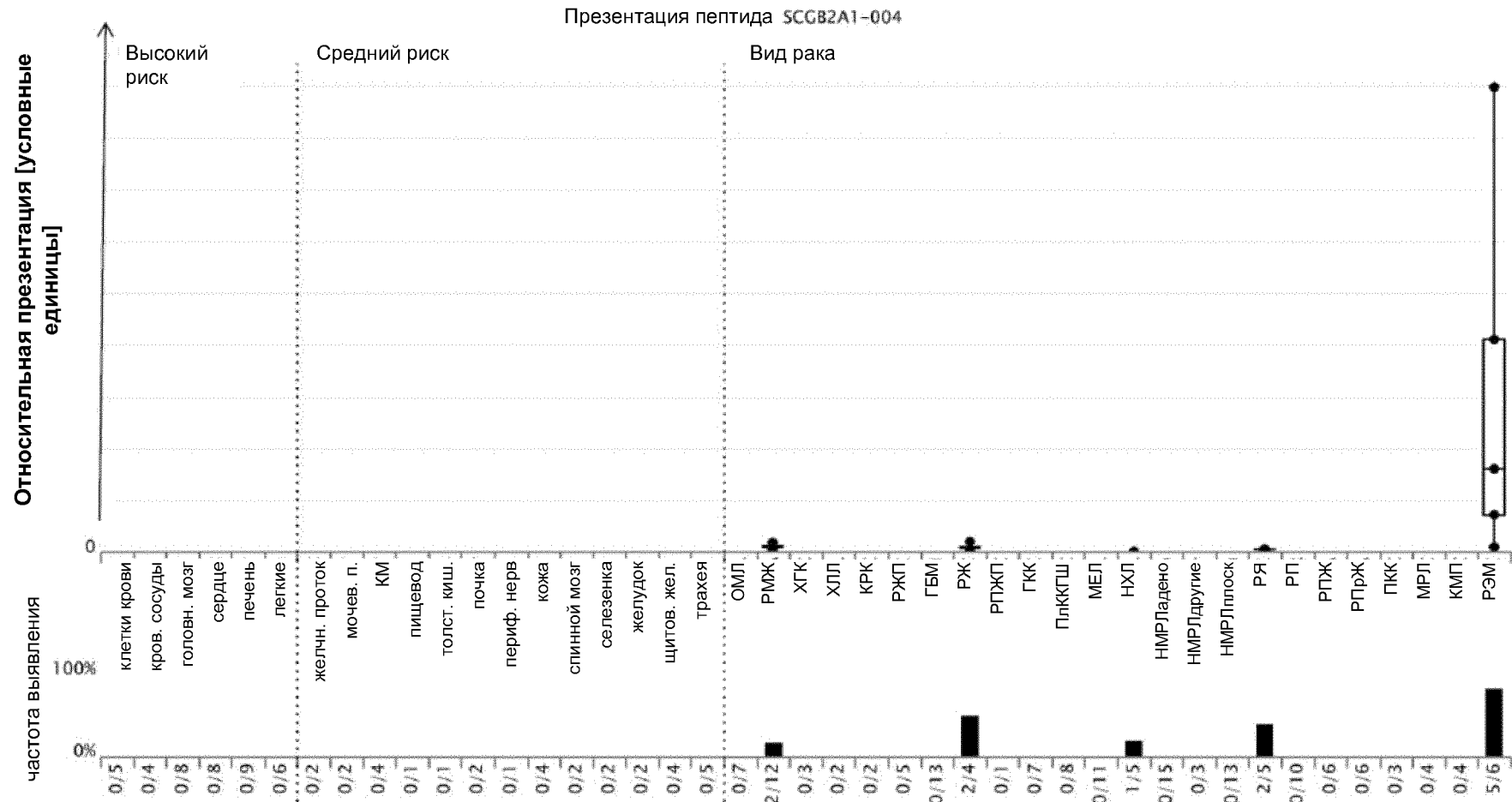
35. Способ диагностики рака у субъекта, где способ включает введение Т-клеточного рецептора или его фрагмента по пп. 6 или 7, или антитела или его фрагмента по п. 5, субъекту или в образец от субъекта, где указанный Т-клеточный рецептор или его фрагмент, или антитело или его фрагмент, помечено зондом или радионуклидом, где способ включает обнаружение связывания указанного Т-клеточного рецептора или его фрагмента или антитела или его фрагмента с тканью субъекта.

36. Способ лечения субъекта, страдающего раком, или предотвращения обусловленных раком страданий у субъекта, включающий введение рекомбинантной клетки-хозяина по п.8 или 9, активированного Т-лимфоцита по п. 11, Т-клеточного рецептора или его фрагмента по п. 6 или 7, или антитела или его фрагмента по п. 5 субъекту.

Фигура 1А

Пептид: NSDISIPEY (A*01)

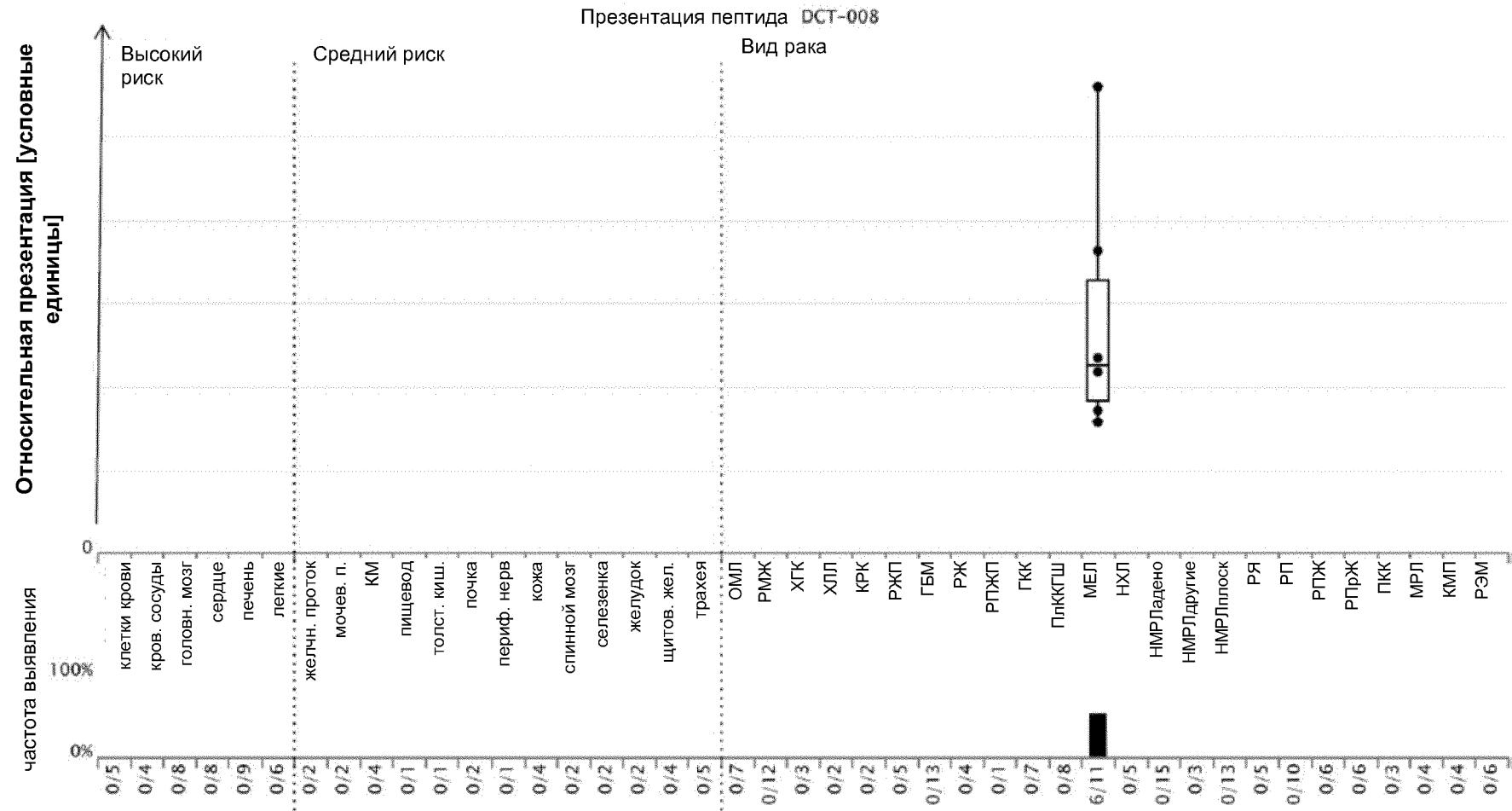
SEQ ID NO: 16



Фигура 1В

Пептид: TSDQLGYSY (A*01)

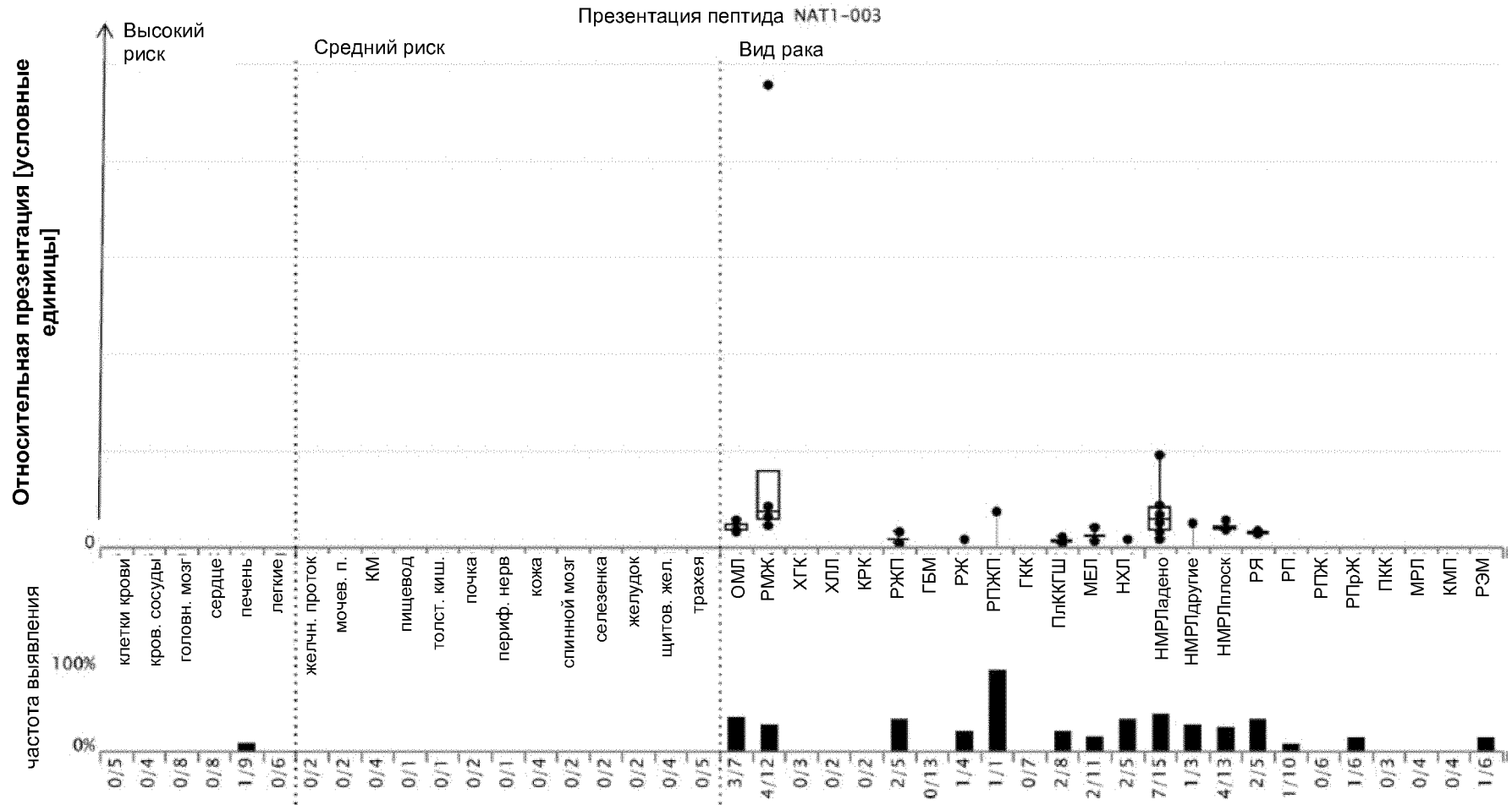
SEQ ID NO: 40



Фигура 1С

Пептид: HSDLLEDSKY (A*01)

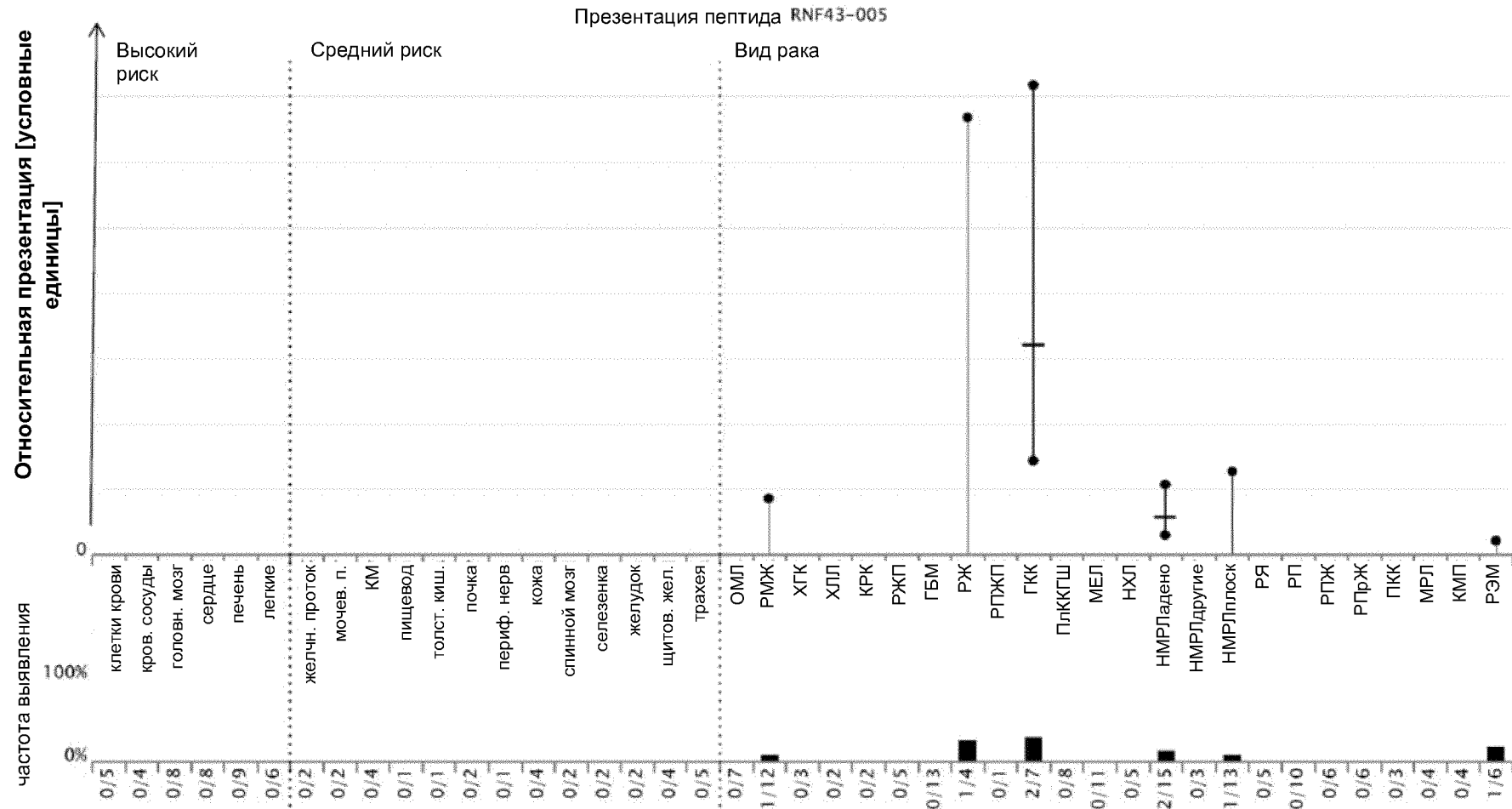
SEQ ID NO: 41



Фигура 1D

Пептид: SSDFDPLVY (A*01)

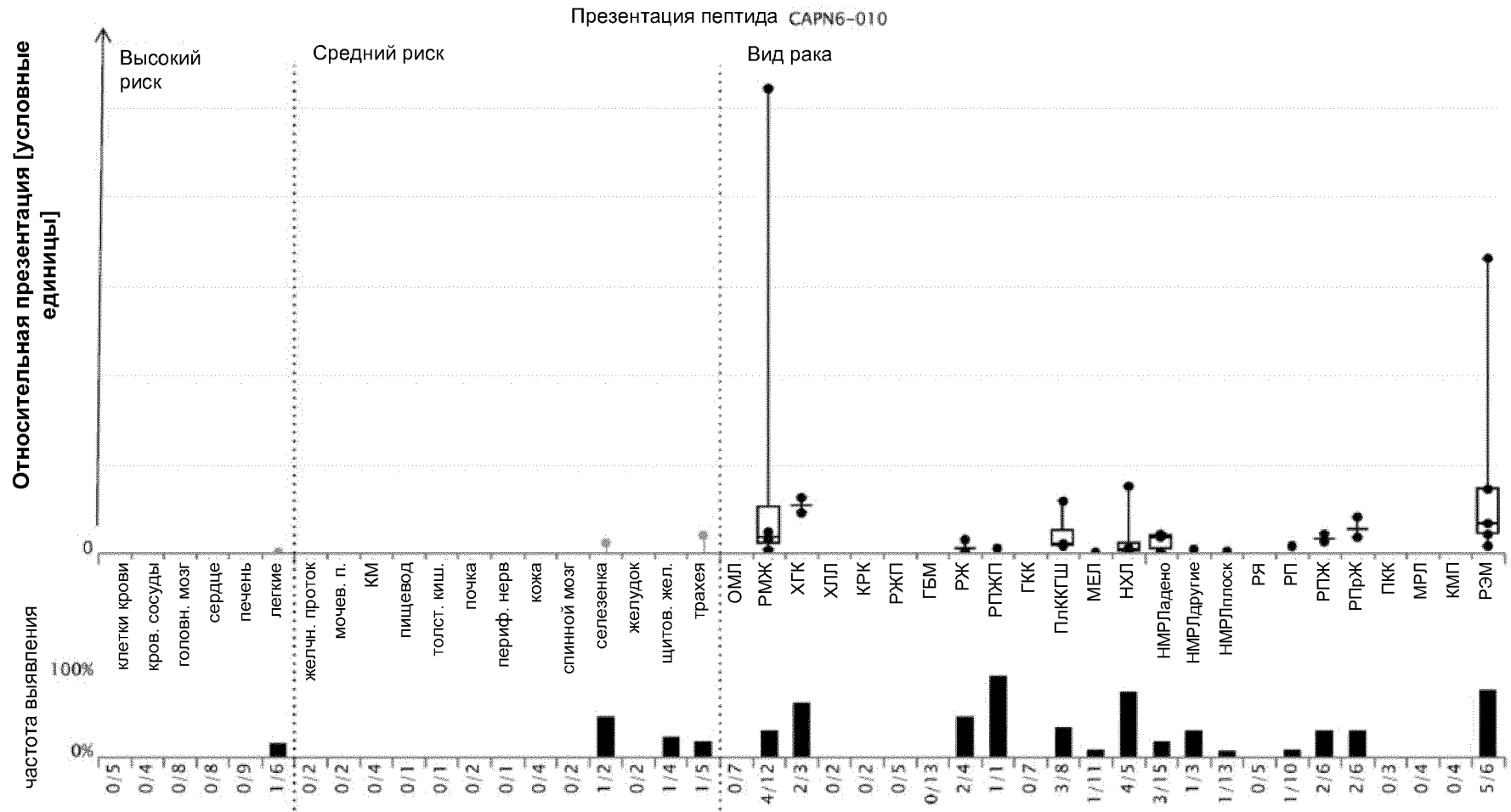
SEQ ID NO: 65



Фигура 1Е

Пептид: YTELVEEKY (A*01)

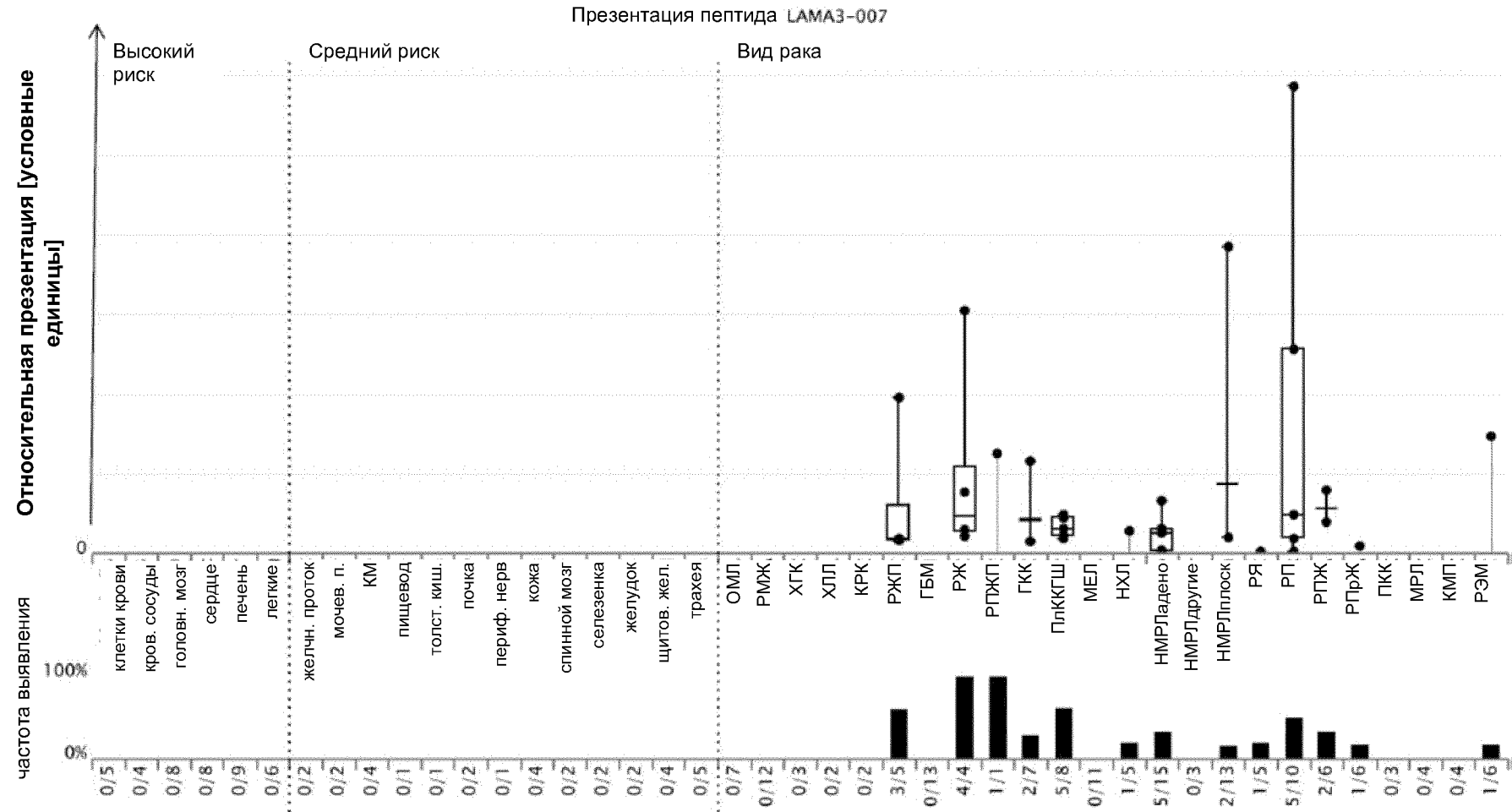
SEQ ID NO: 70



Фигура 1F

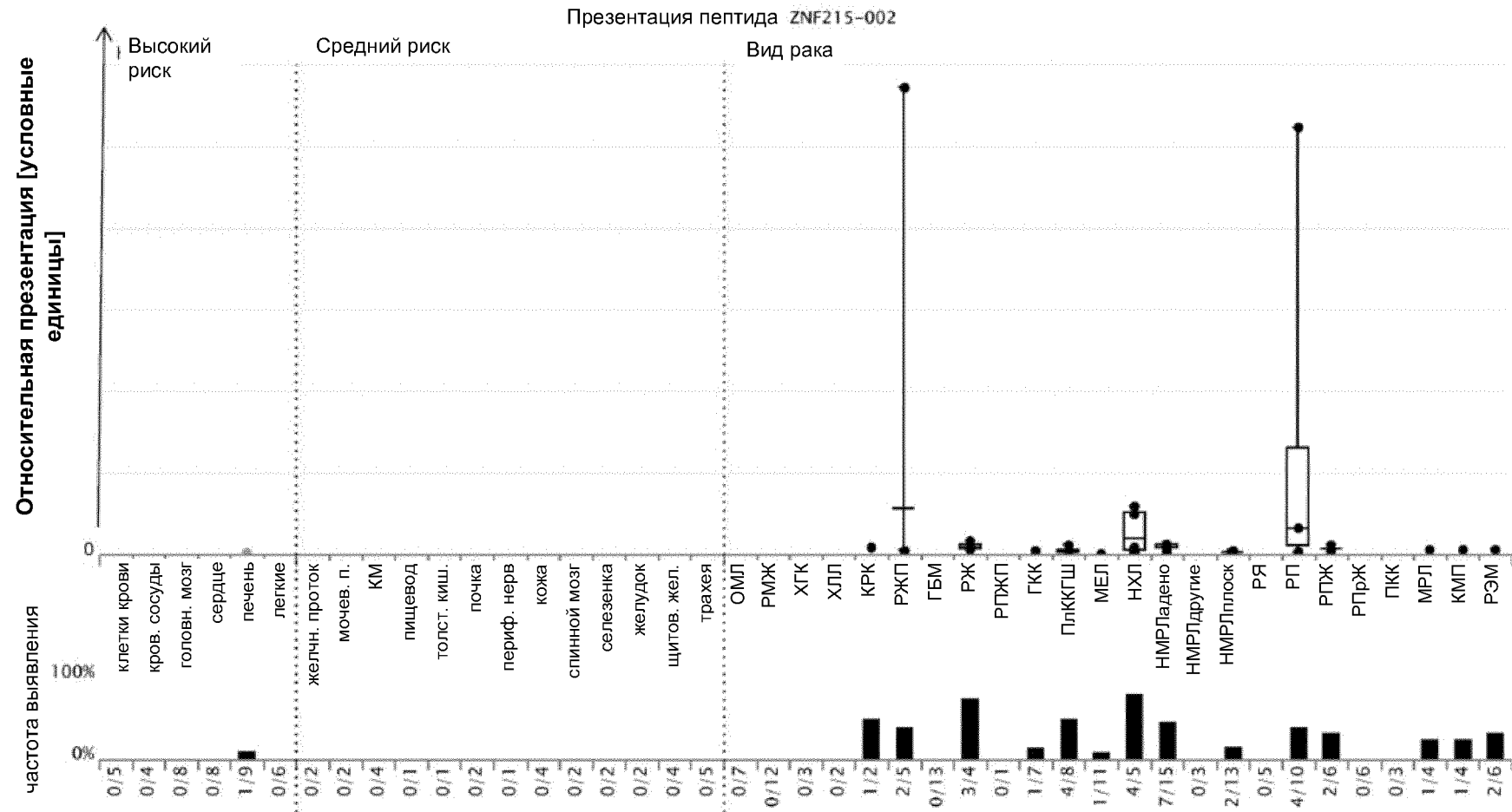
Пептид: QTDVERIKDTY (A*01)

SEQ ID NO: 76



Фигура 1G

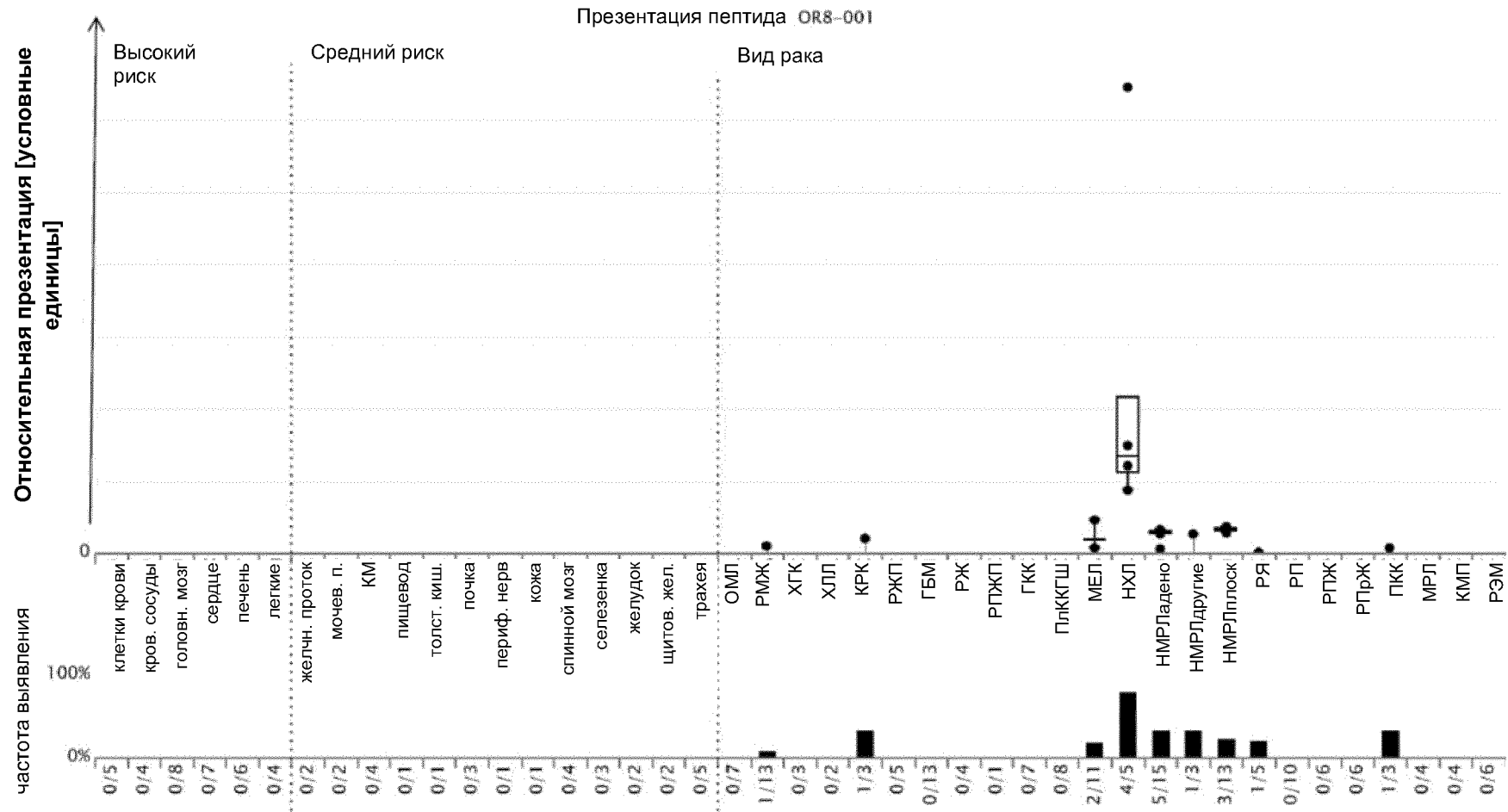
Пептид: QLDSAVKNLY (A*01)
SEQ ID NO: 78



Фигура 1Н

Пептид: HMLAAMAY (A*01)

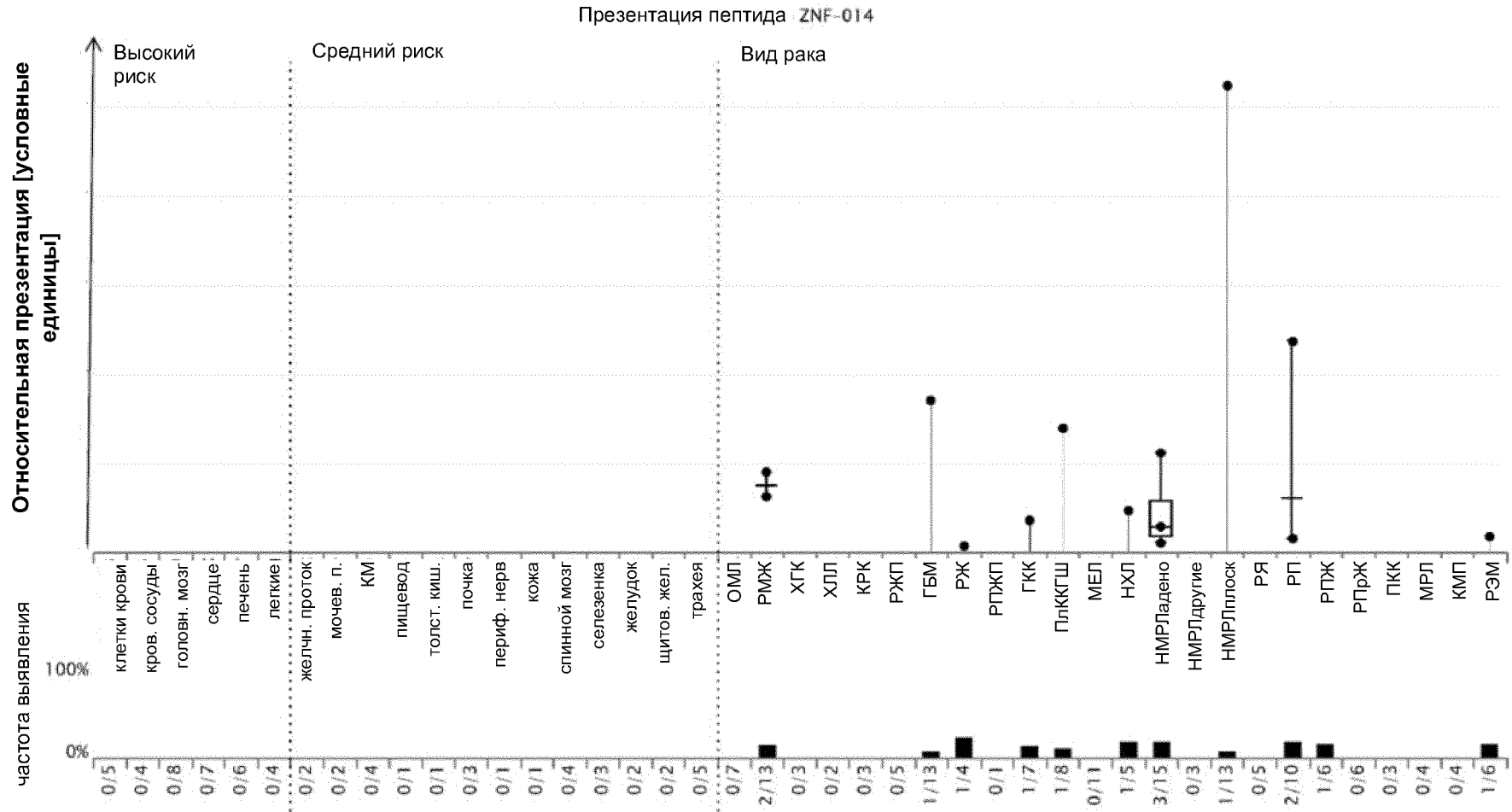
SEQ ID NO: 296



Фигура 11

Пептид: YTCEECGQAF (A*01)

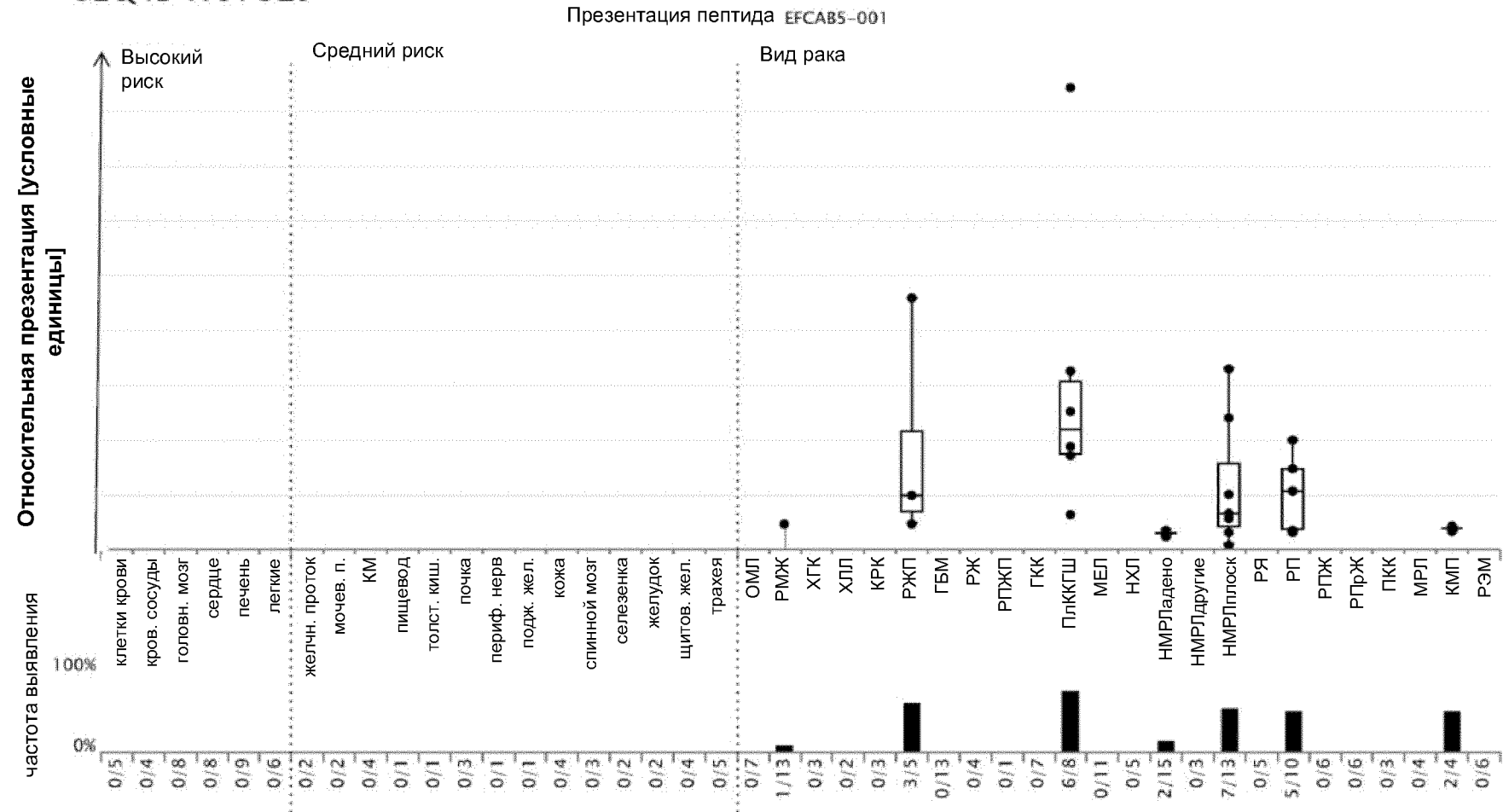
SEQ ID NO: 316



Фигура 1J

Пептид: NTDSMTLNNTAY (A*01)

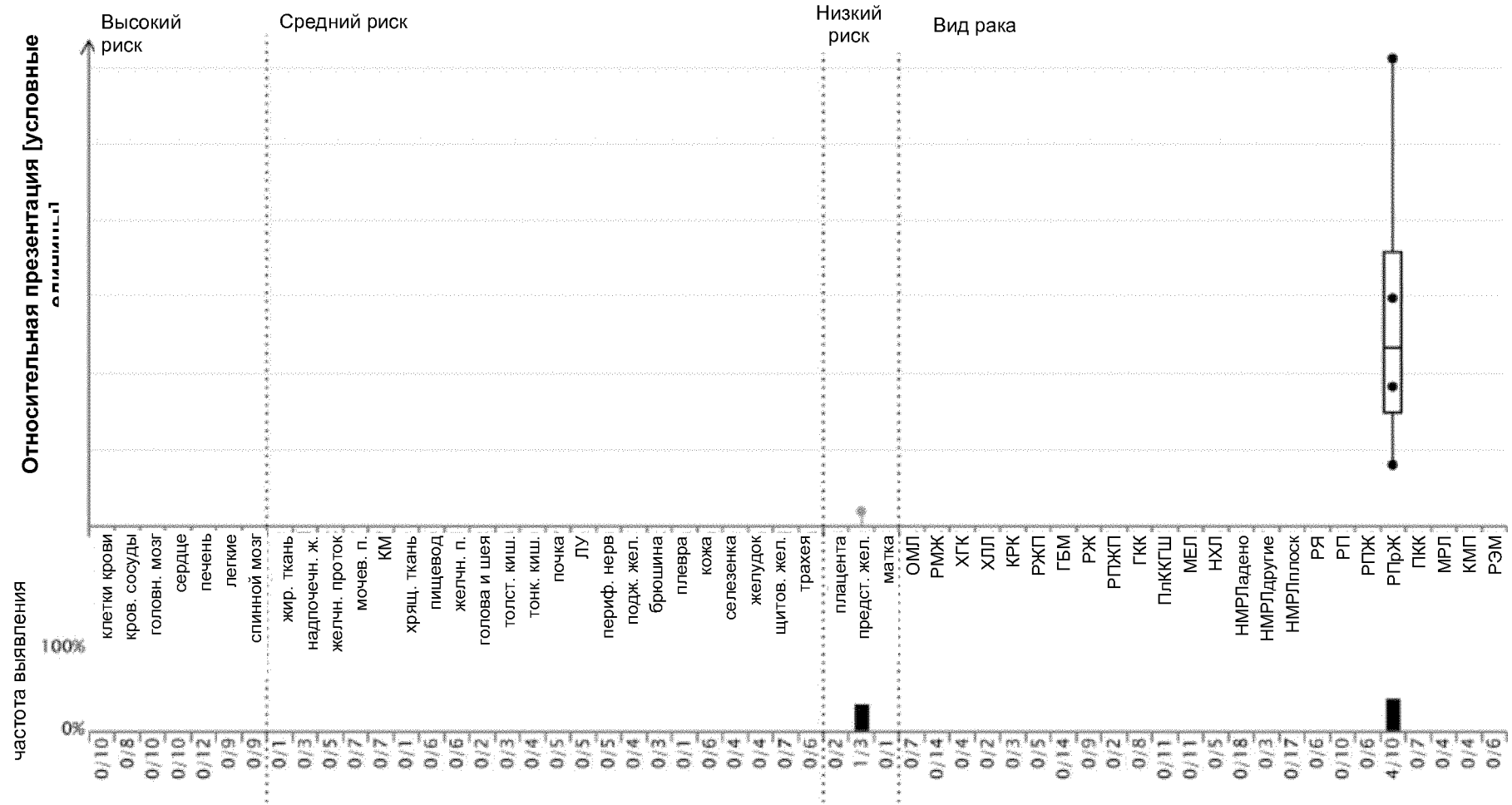
SEQ ID NO: 329



Фигура 1К

Пептид: TLDSTRTLY (A*01)

SEQ ID NO: 1

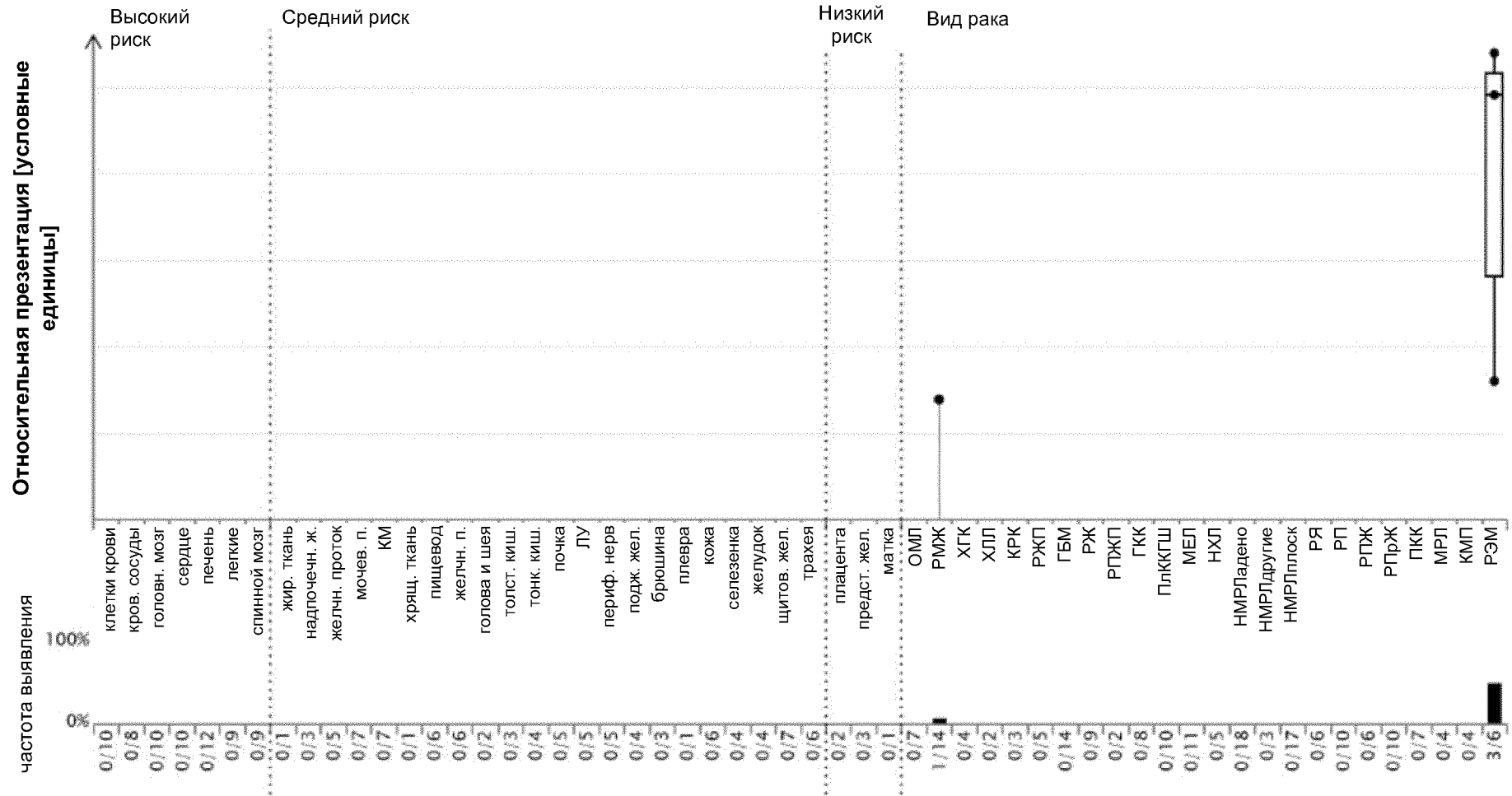


Фигура 1L

Пептид: YLDSSKPAVY (A*01)

SEQ ID NO: 15

Презентация пептида ESR1-016

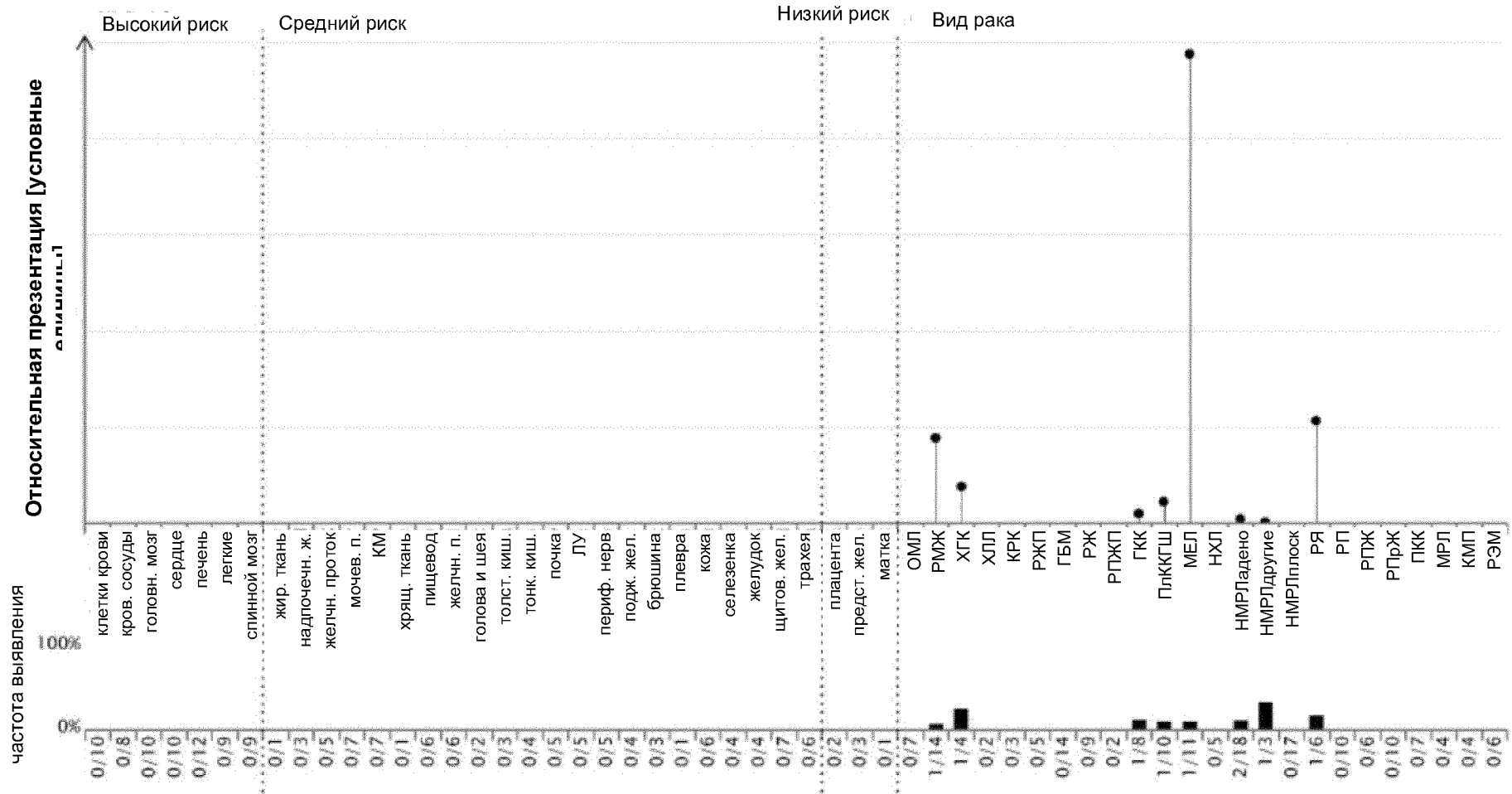


Фигура 1М

Пептид: PSEVPVDSHYY (A*01)

SEQ ID NO: 28

Презентация пептида LOXL4-006

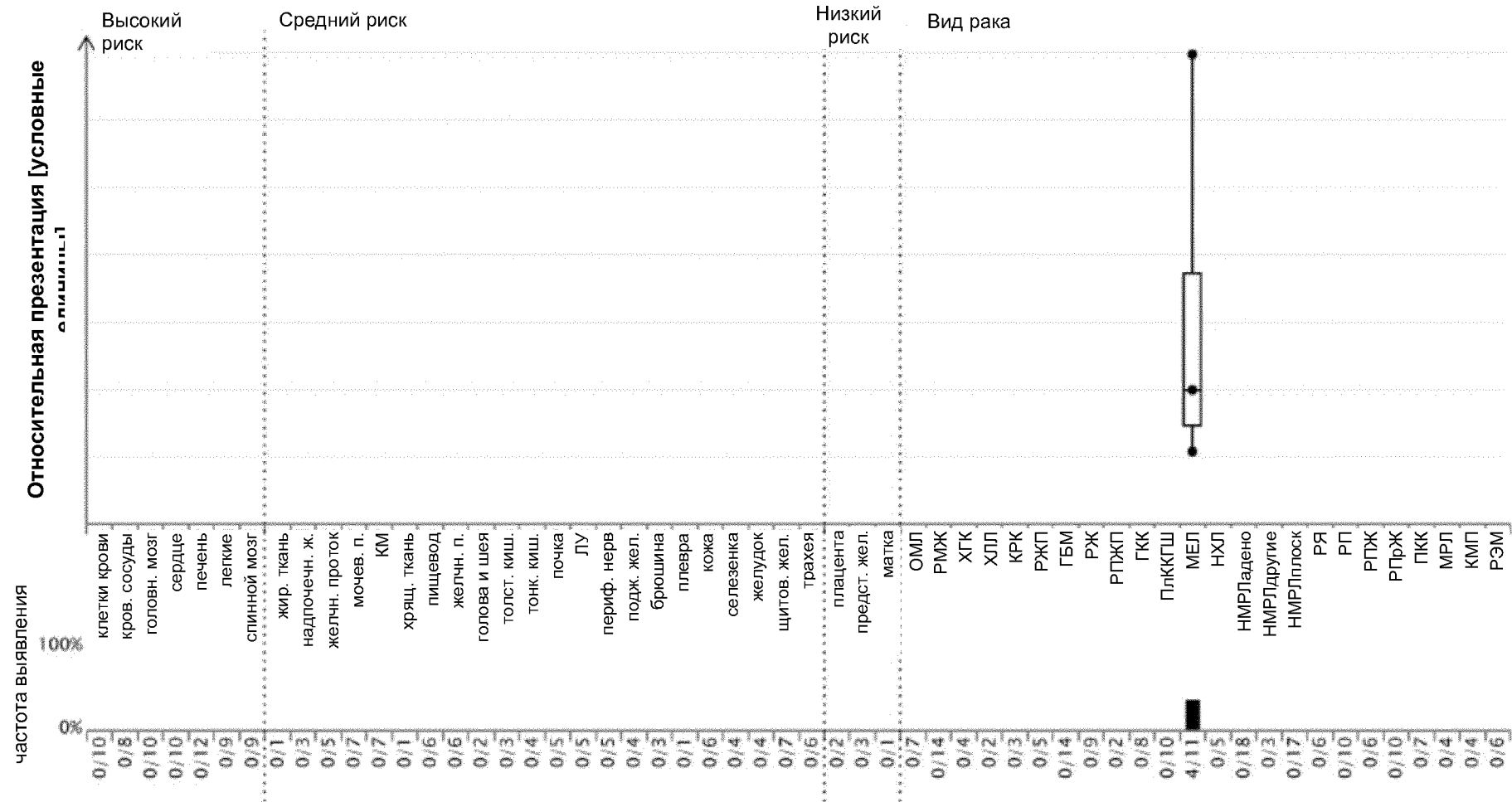


Фигура 1N

Пептид: LMEKEDYHSLY (A*01)

SEQ ID NO: 387

Презентация пептида TYR-010

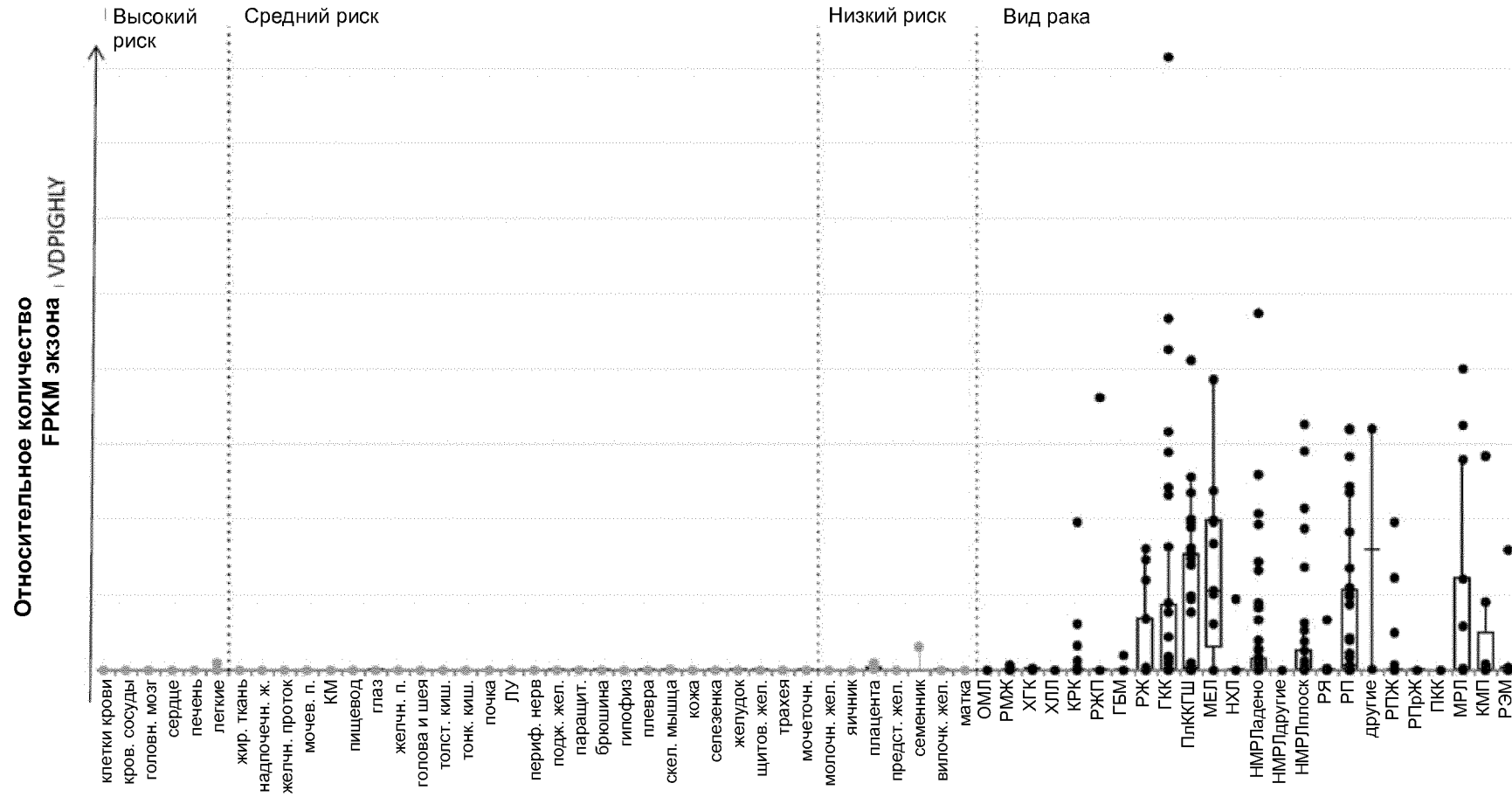


Фигура 2А

Ген: MAGEA3

Пептид: VDPIGHLY

SEQ ID NO: 2

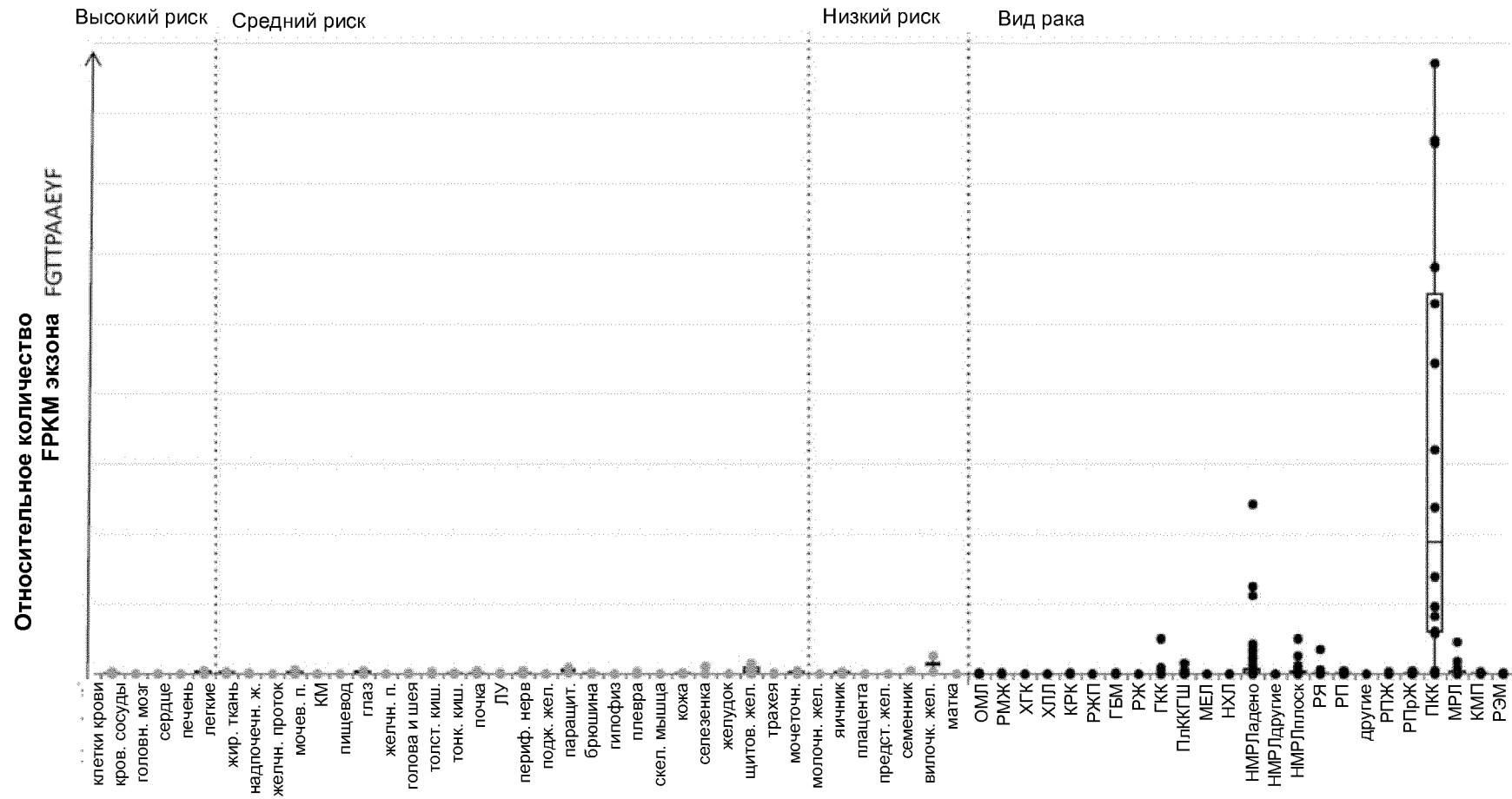


Фигура 2В

Ген: SLC6A3

Пептид: FGTPRAAEYF

SEQ ID NO: 3

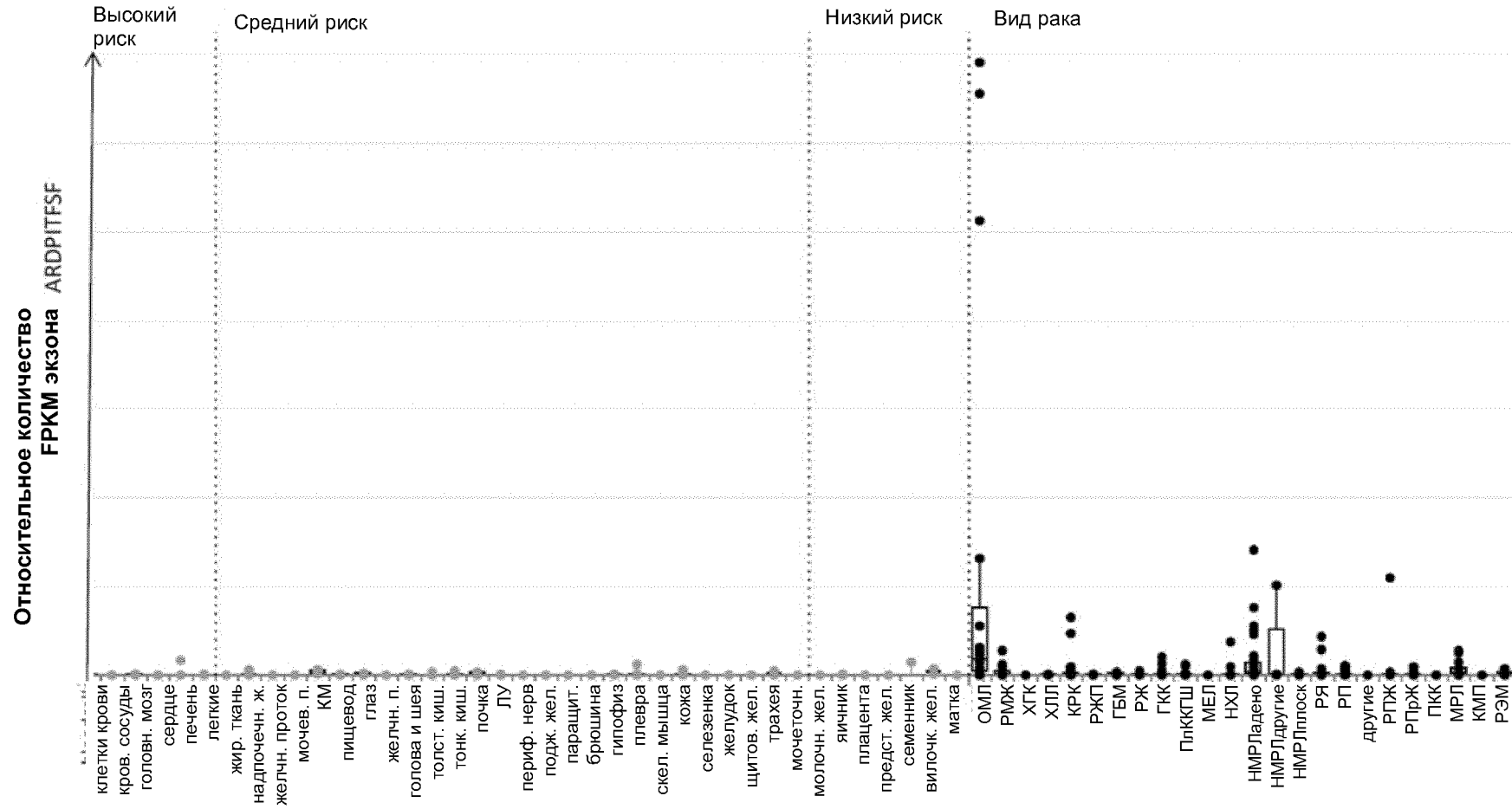


Фигура 2С

Ген: UMODL1

Пептид: ARDPITFSF

SEQ ID NO: 6

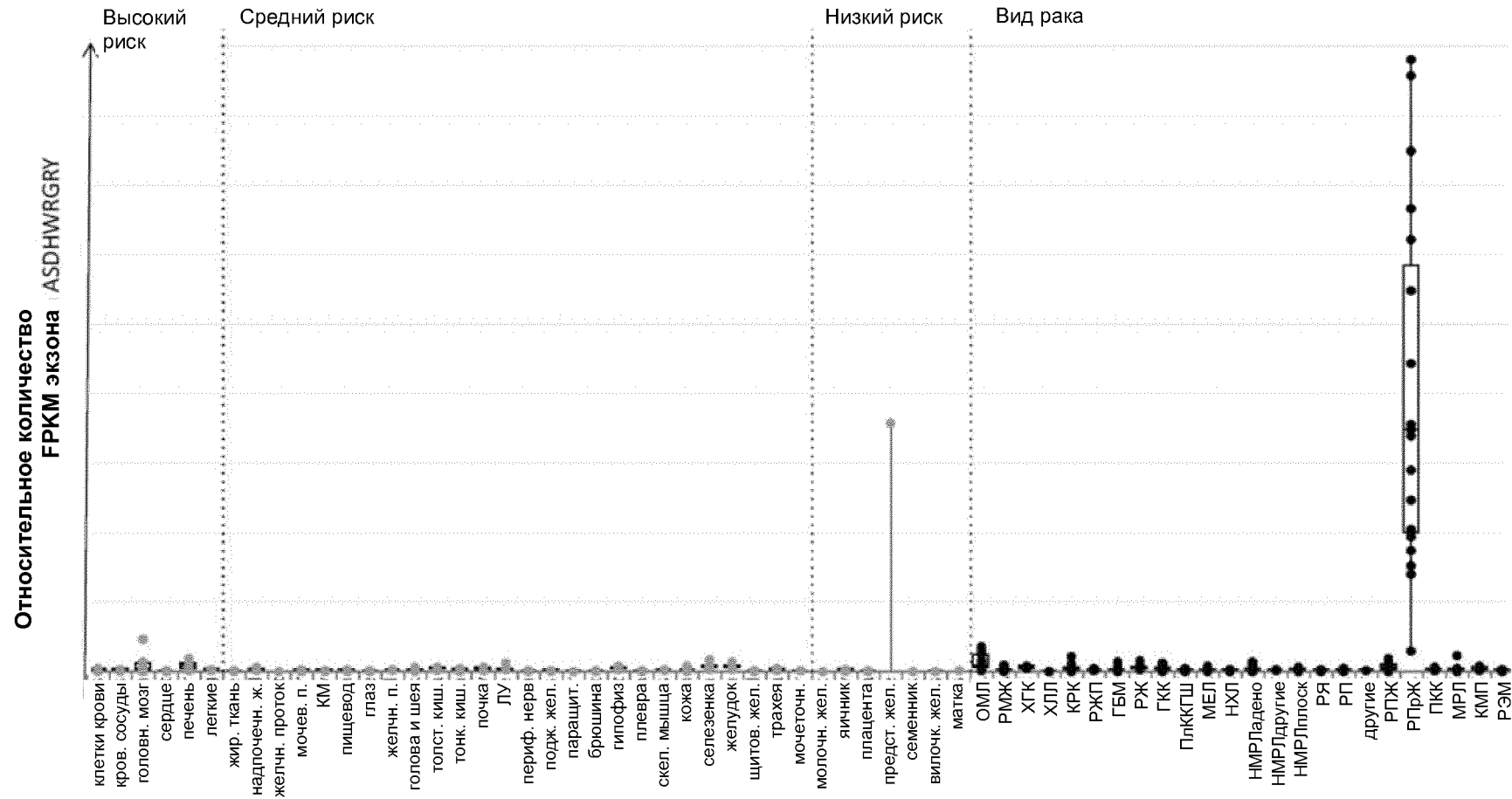


Фигура 2D

Ген: SLC45A3

Пептид: ASDHWRGRY

SEQ ID NO: 11

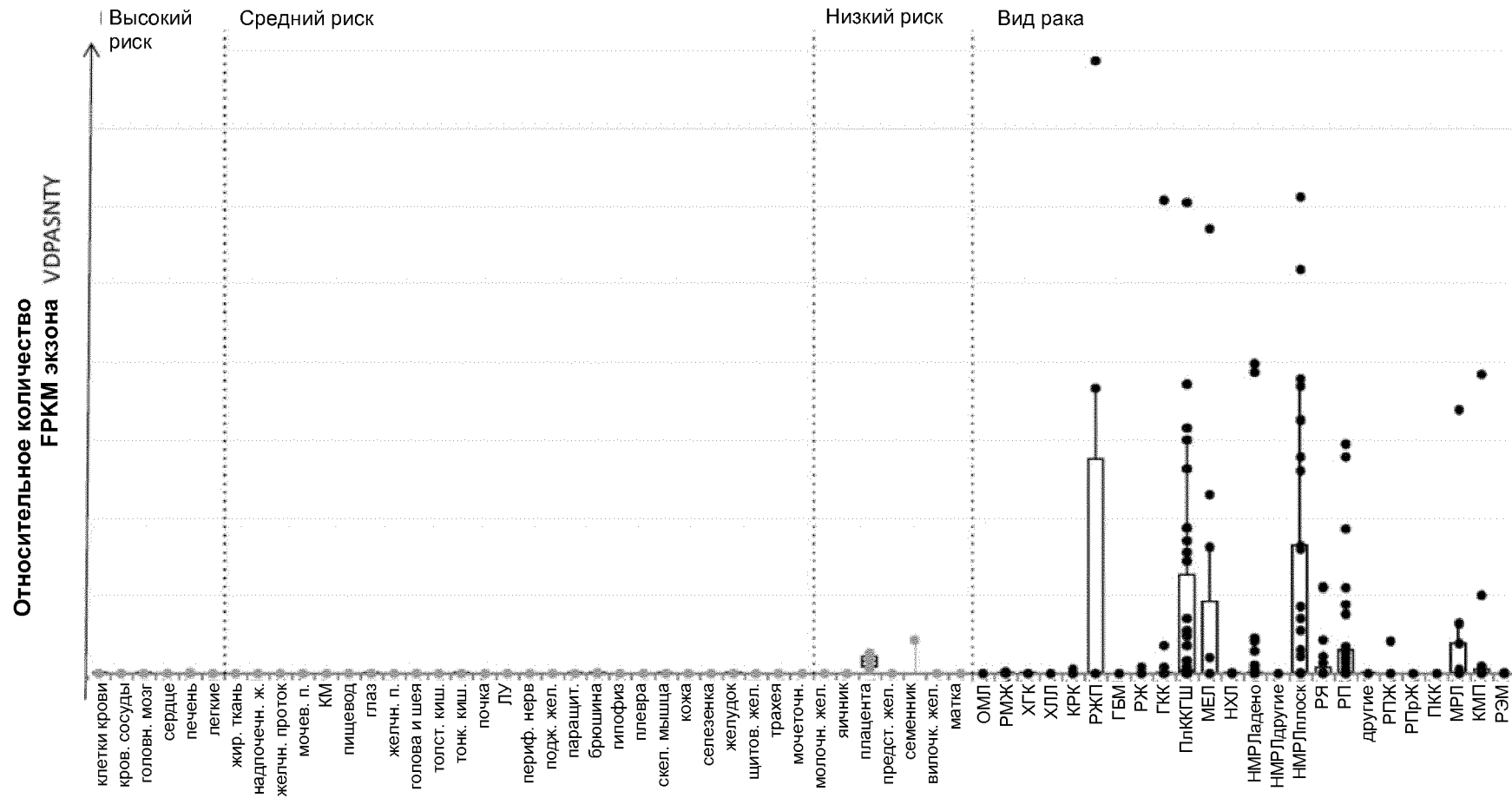


Фигура 2Е

Ген: MAGEA4

Пептид: VDPASNTY

SEQ ID NO: 86

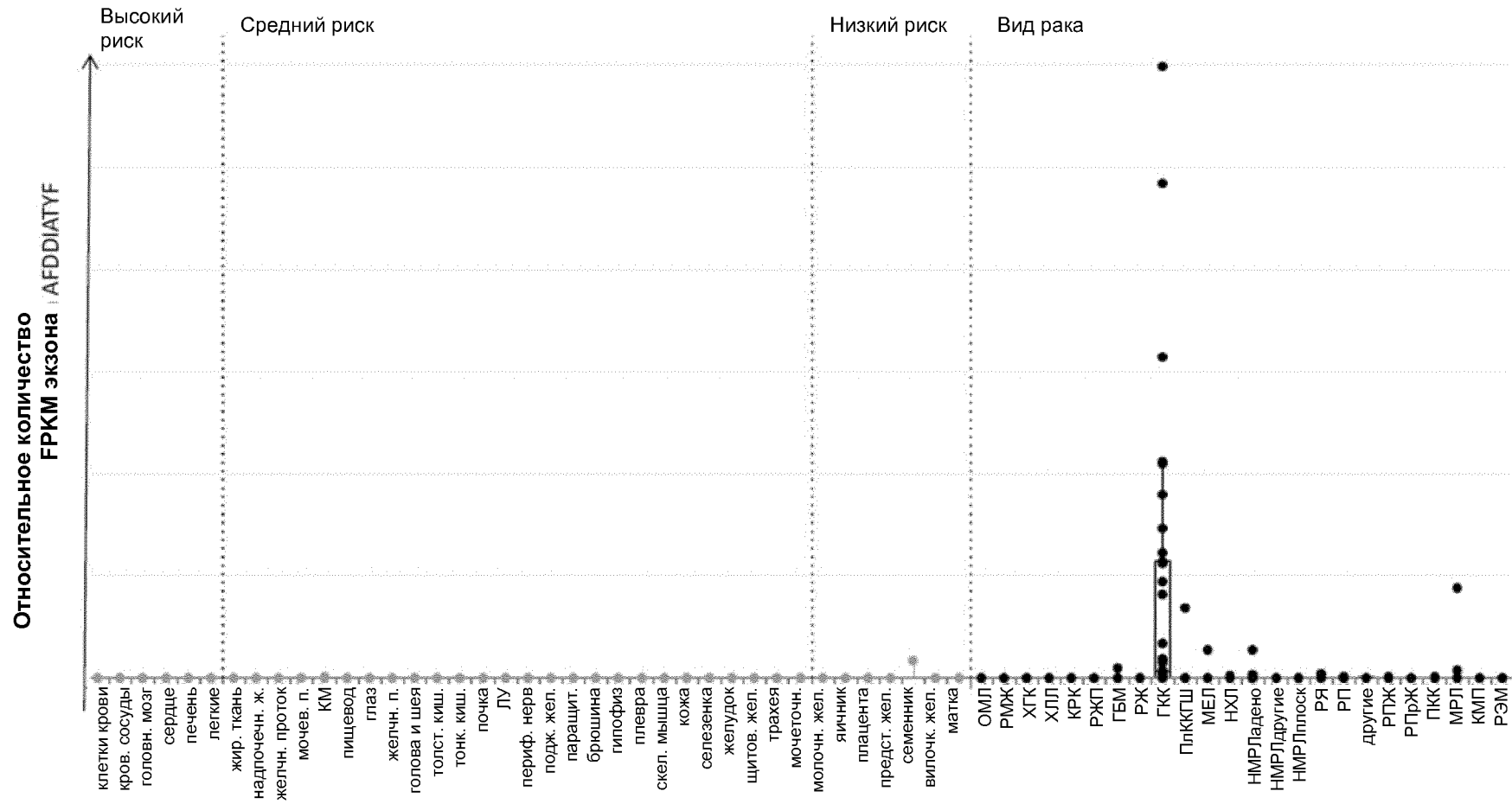


Фигура 2F

Ген: SSX1

Пептид: AFDDIATYF

SEQ ID NO: 87

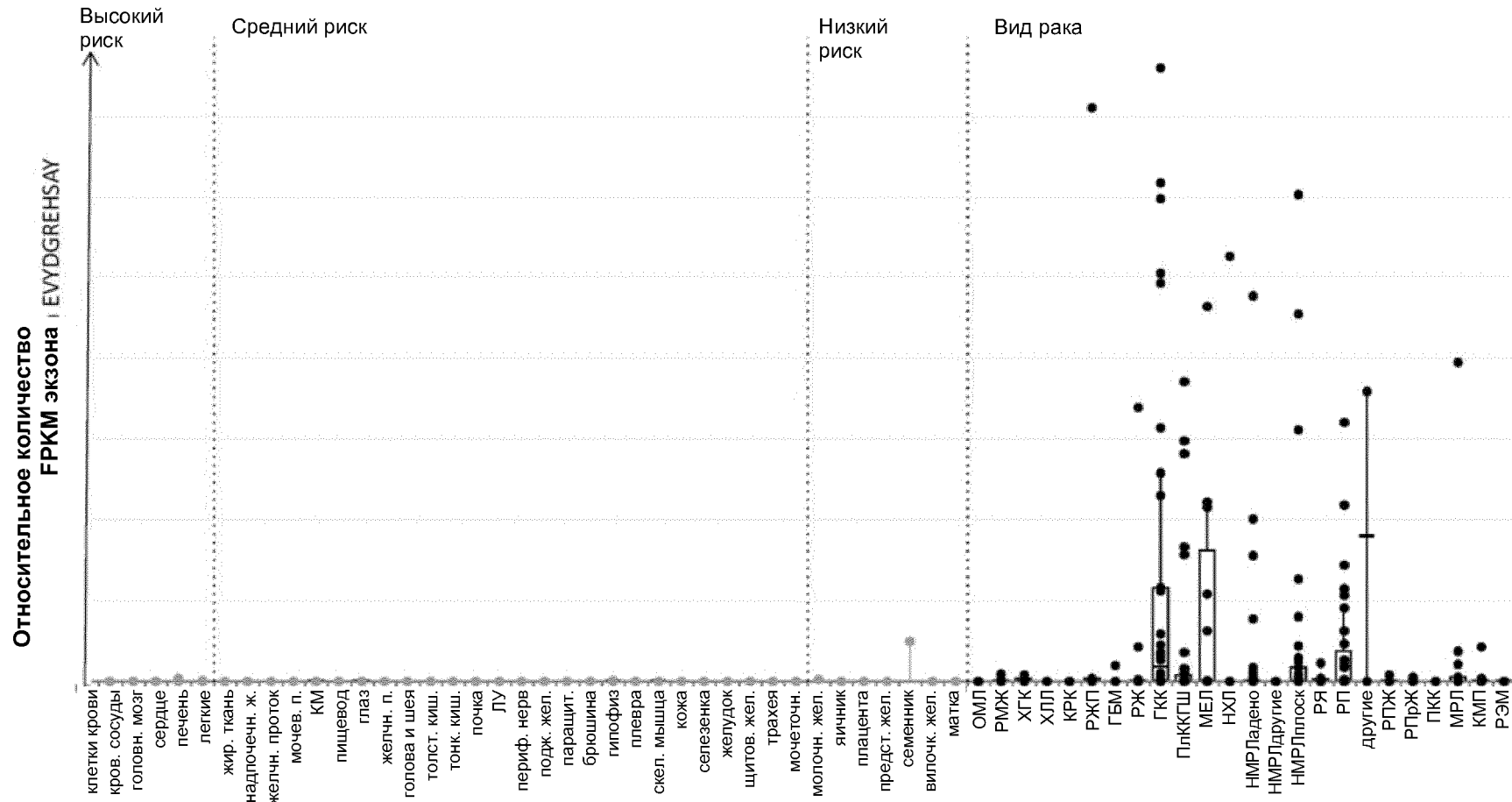


Фигура 2G

Ген: MAGEA1

Пептид: EVYDGREHSAY

SEQ ID NO: 89

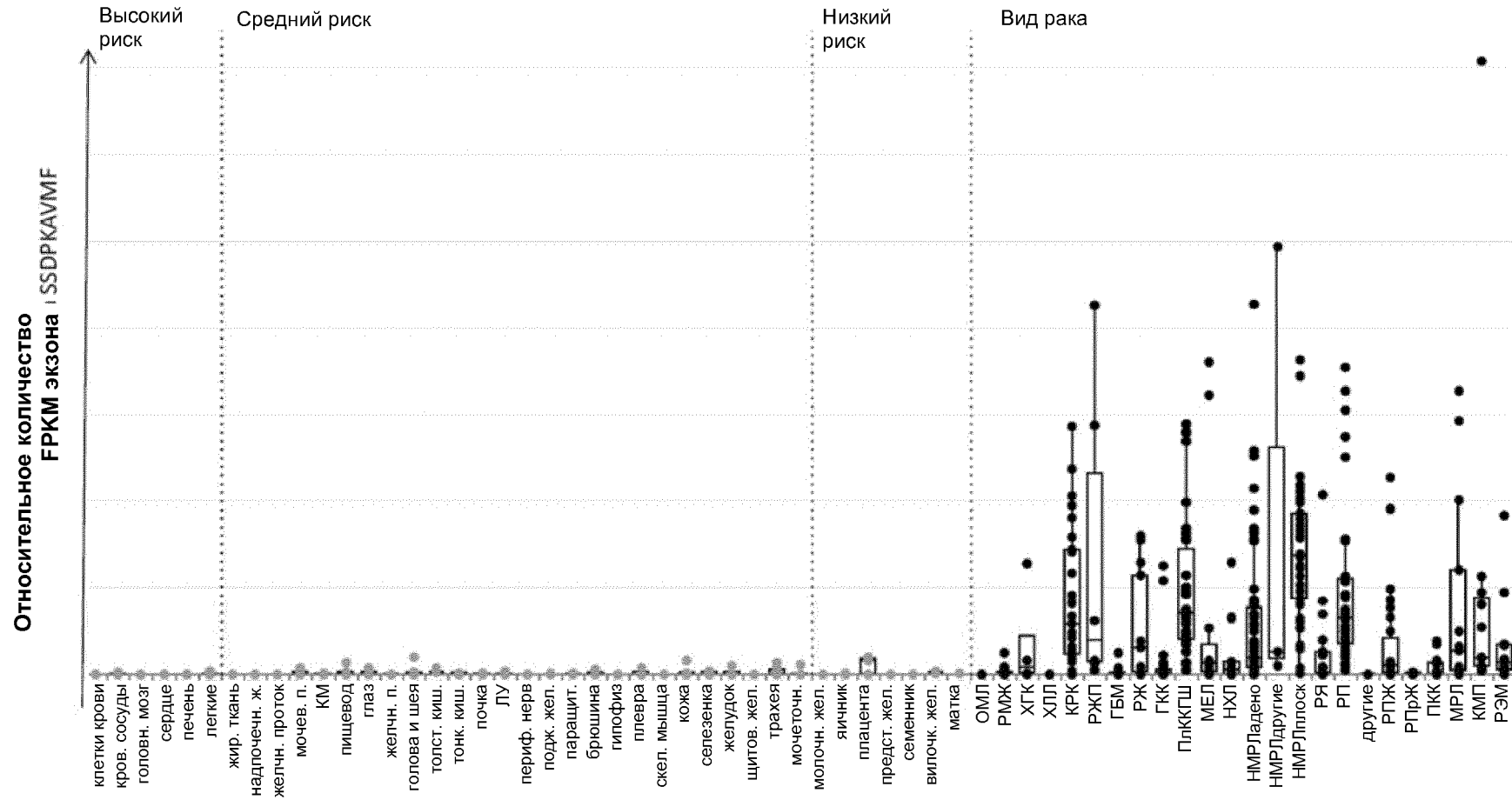


Фигура 2Н

Ген: MMP12

Пептид: SSDPKAVMF

SEQ ID NO: 95

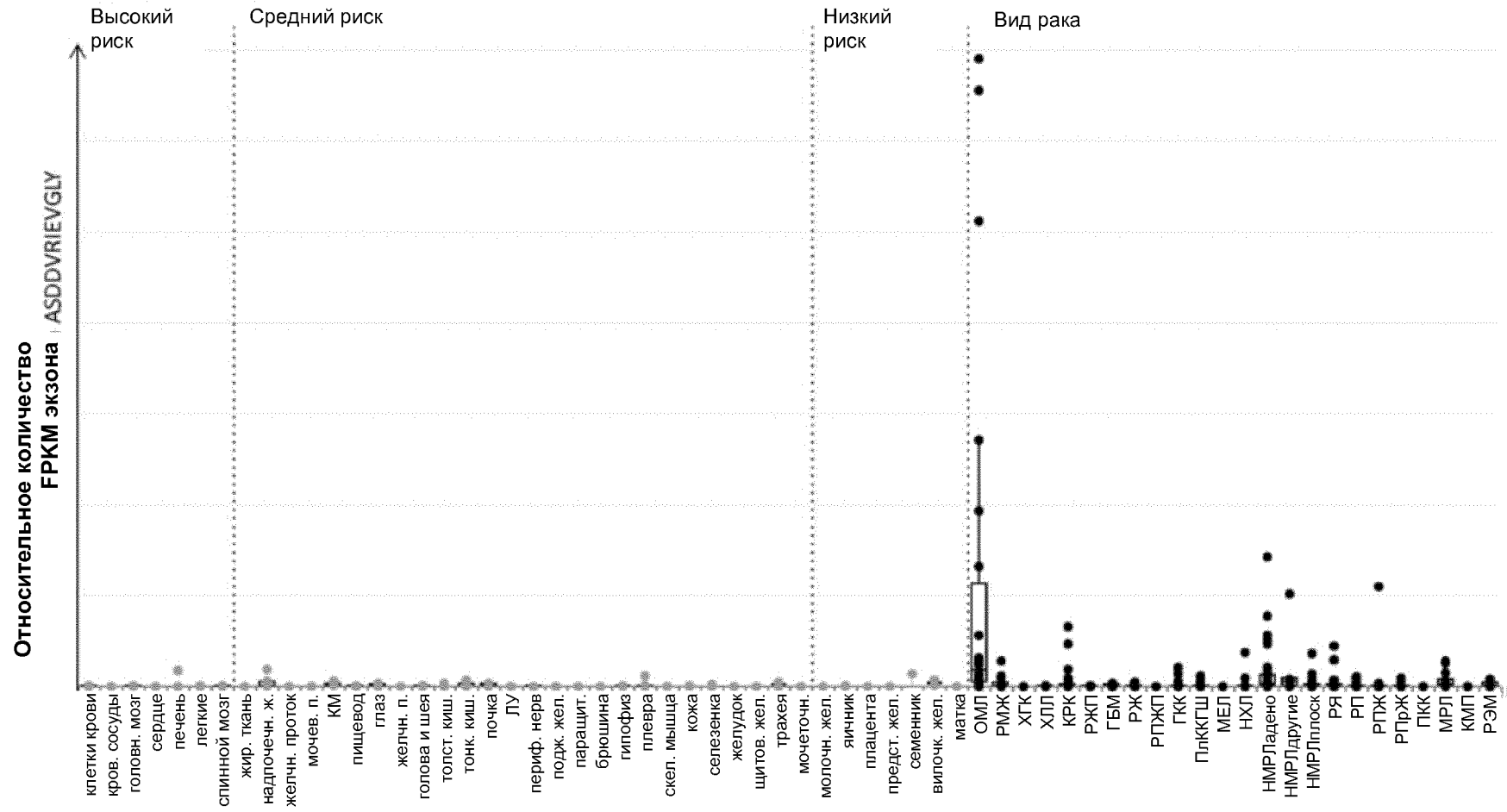


Фигура 2I

Ген: UMODL1

Пептид: ASDDVRIEVGLY

SEQ ID NO: 7

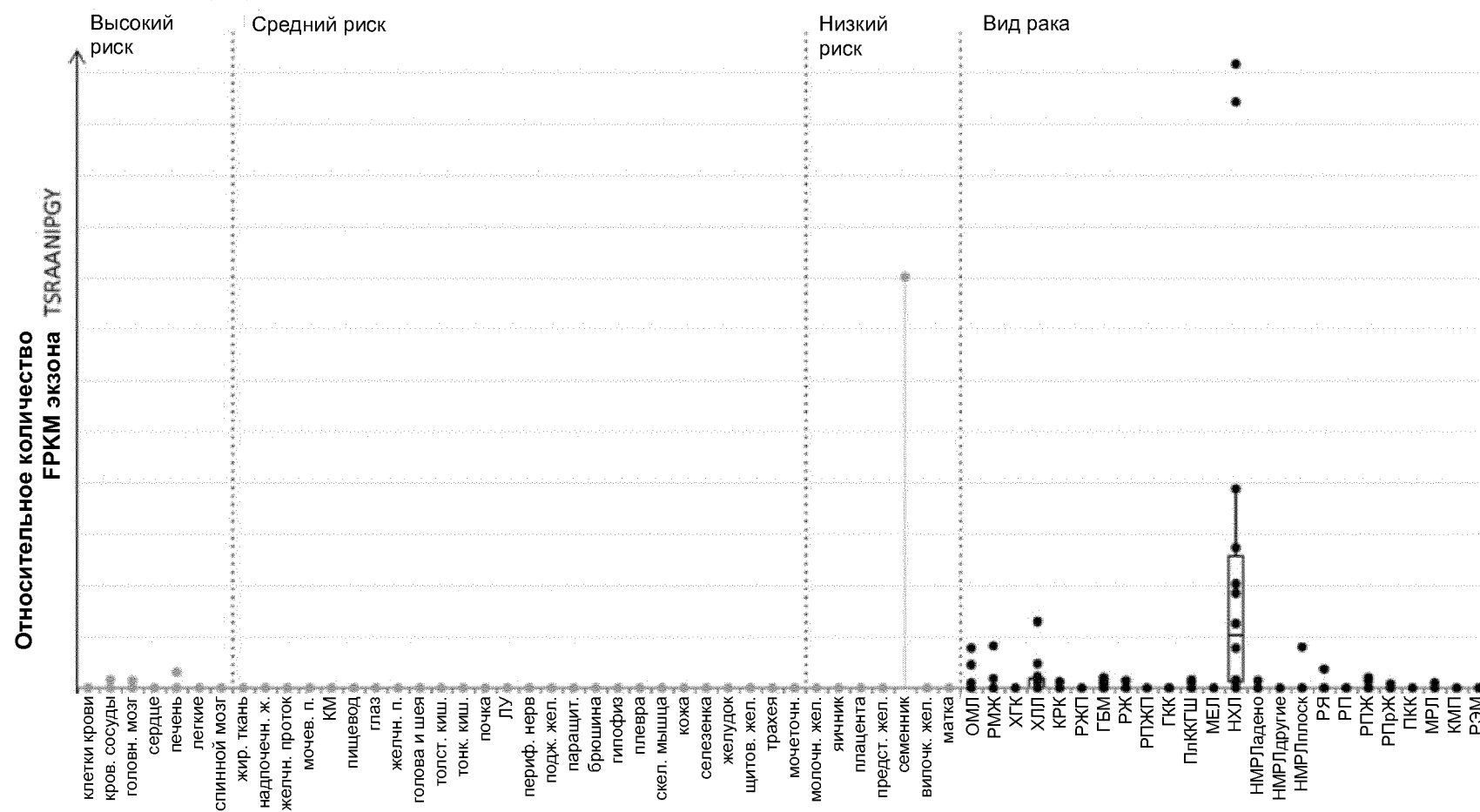


Фигура 2J

Ген: C7orf72

Пептид: TSRAANIPGY

SEQ ID NO: 8

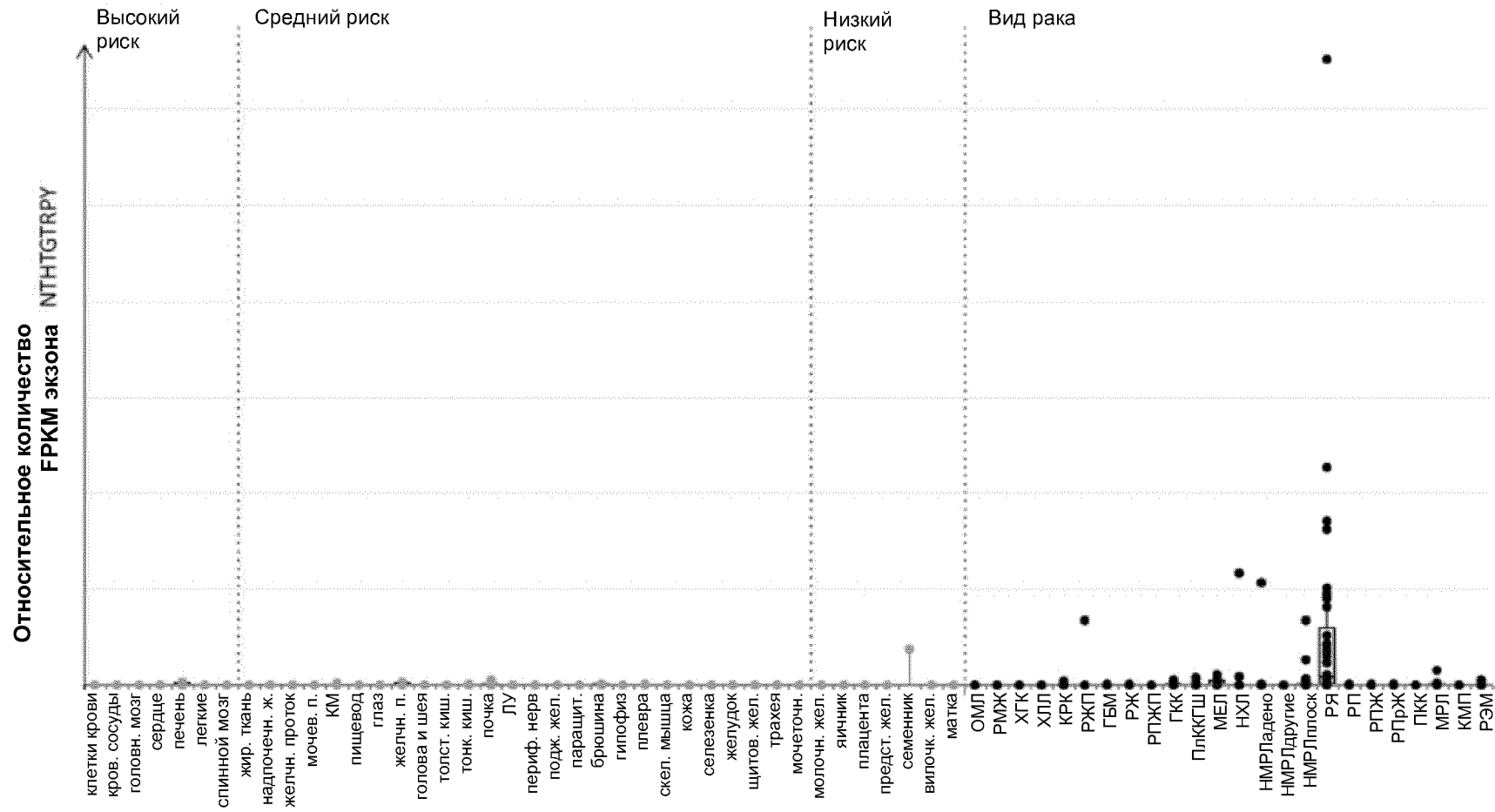


Фигура 2К

Ген: CTCFL

Пептид: NTHTGTRPY

SEQ ID NO: 13

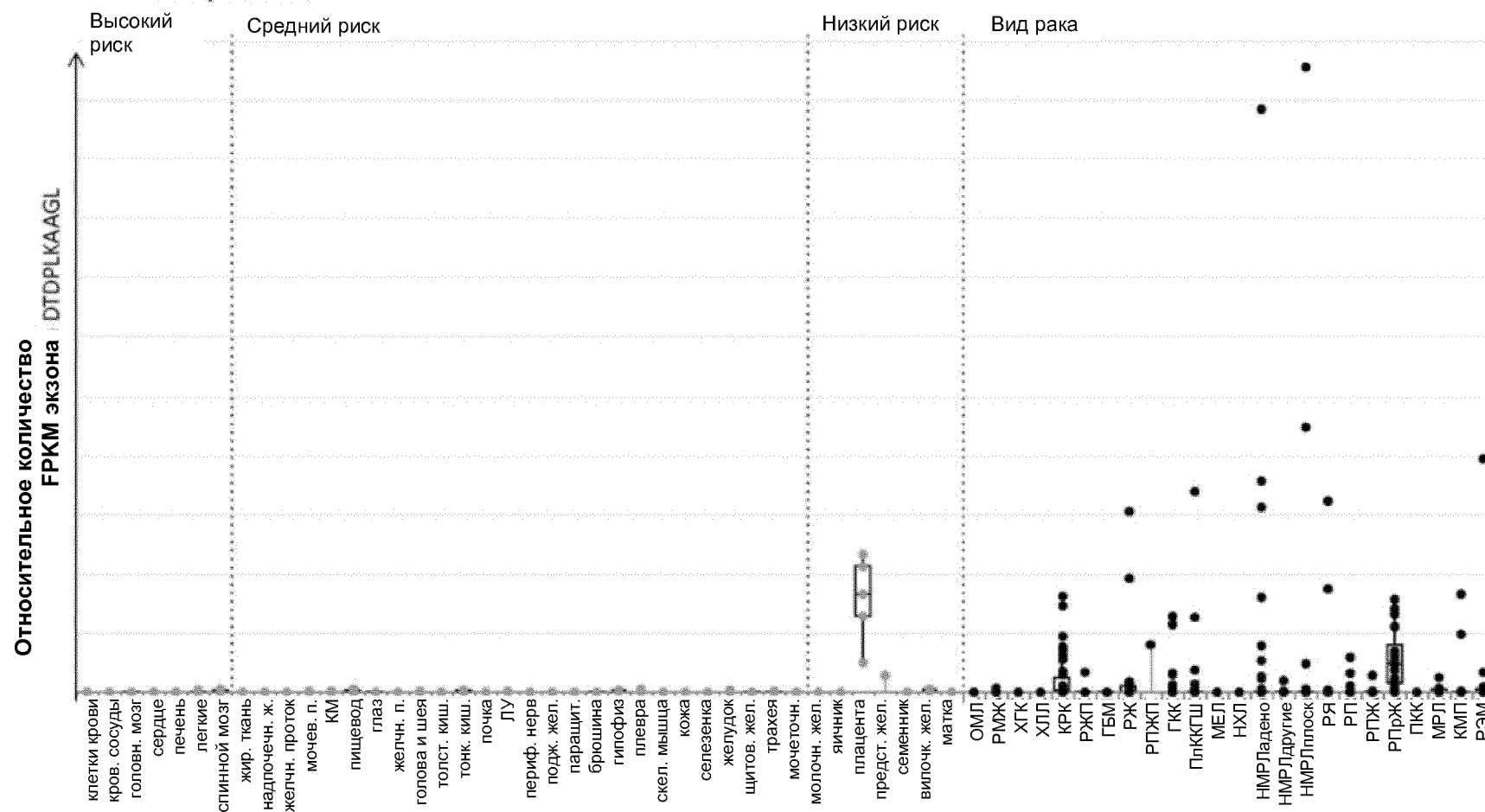


Фигура 2L

Ген: SOX14

Пептид: DTDPLKAAGL

SEQ ID NO: 23

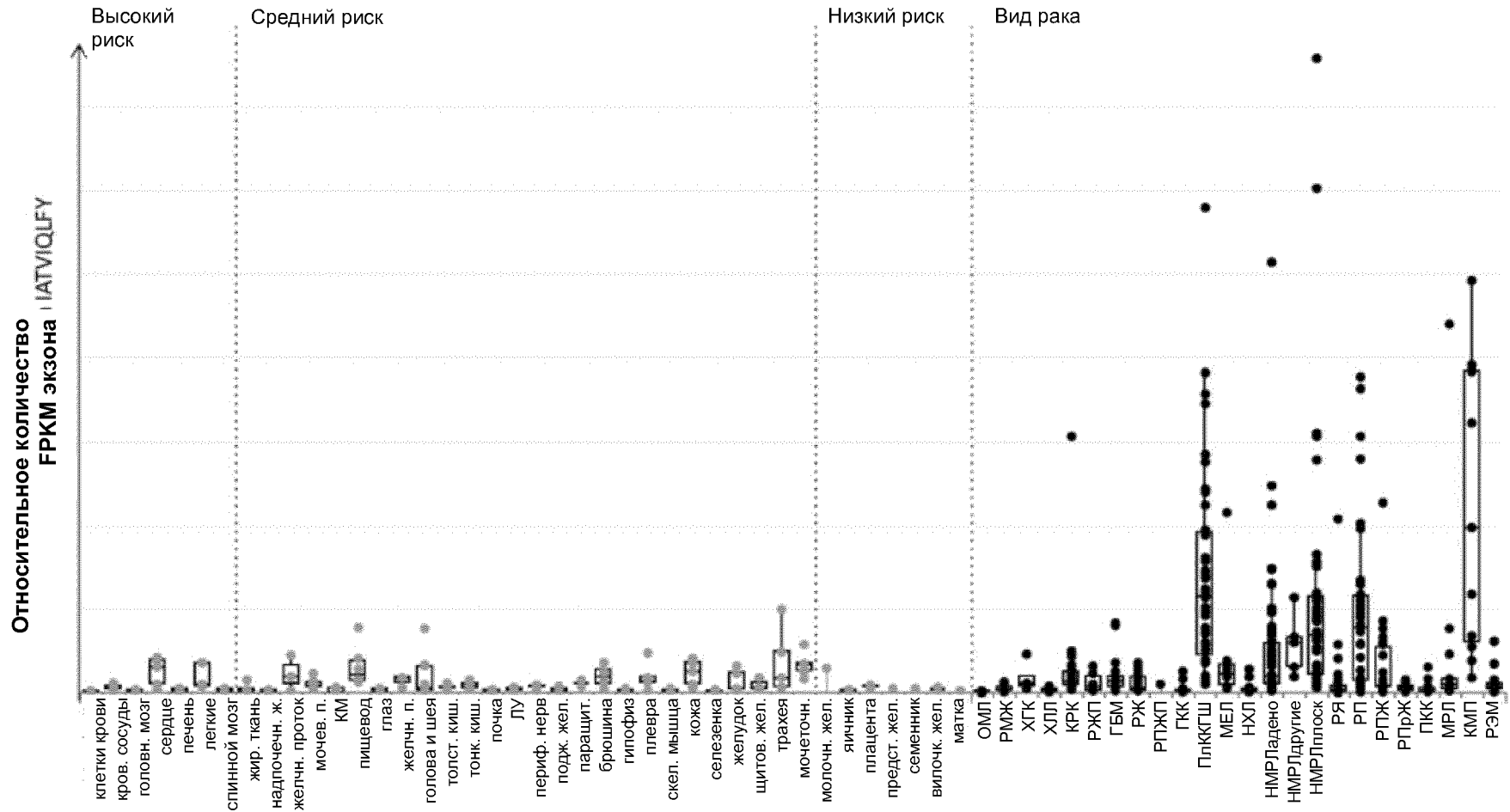


Фигура 2М

Ген: HAS2, HAS3

Пептид: IATVIQLFY

SEQ ID NO: 66

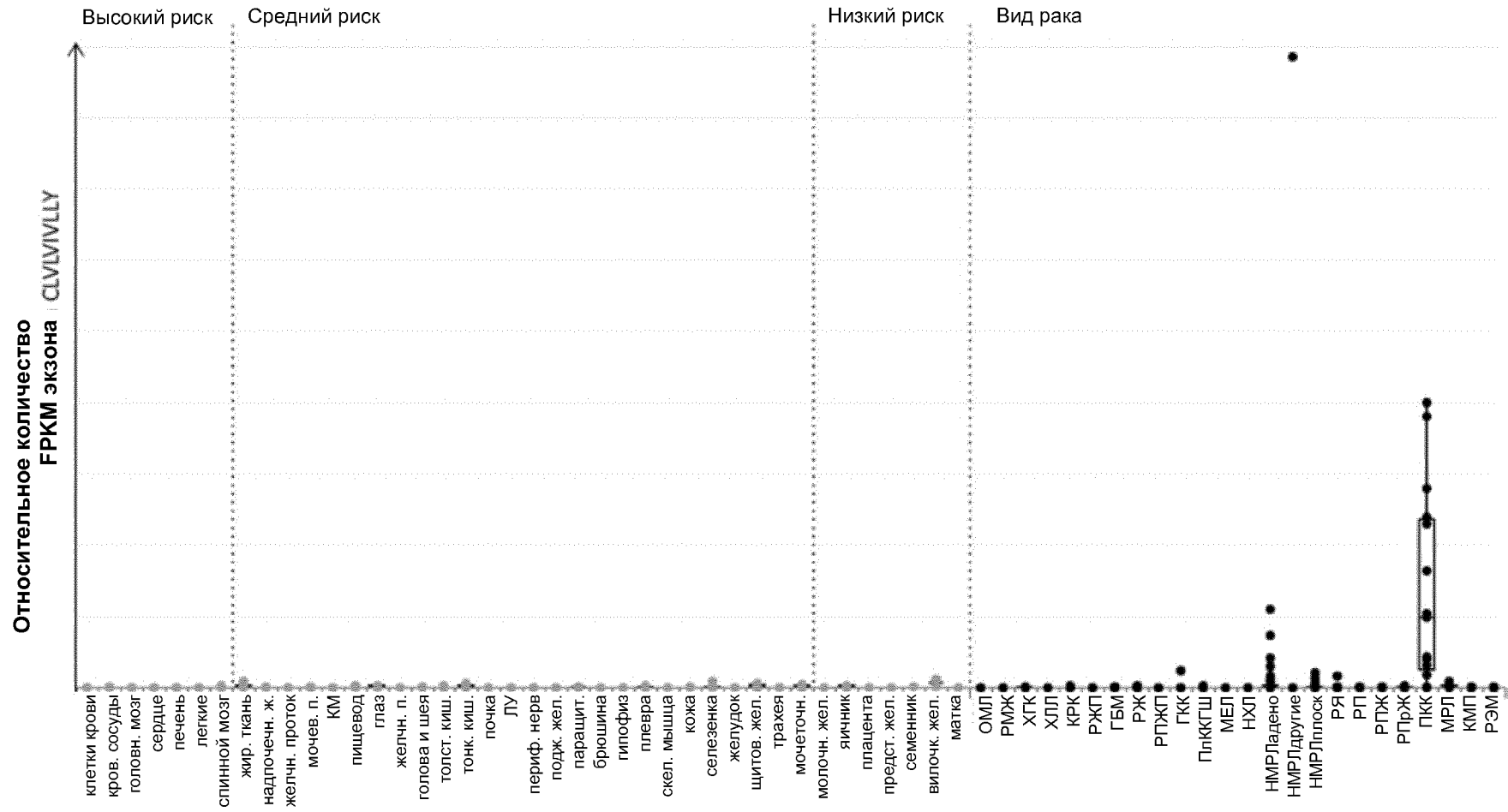


Фигура 2N

Ген: SLC6A3

Пептид: CLVLVIVLLY

SEQ ID NO: 91

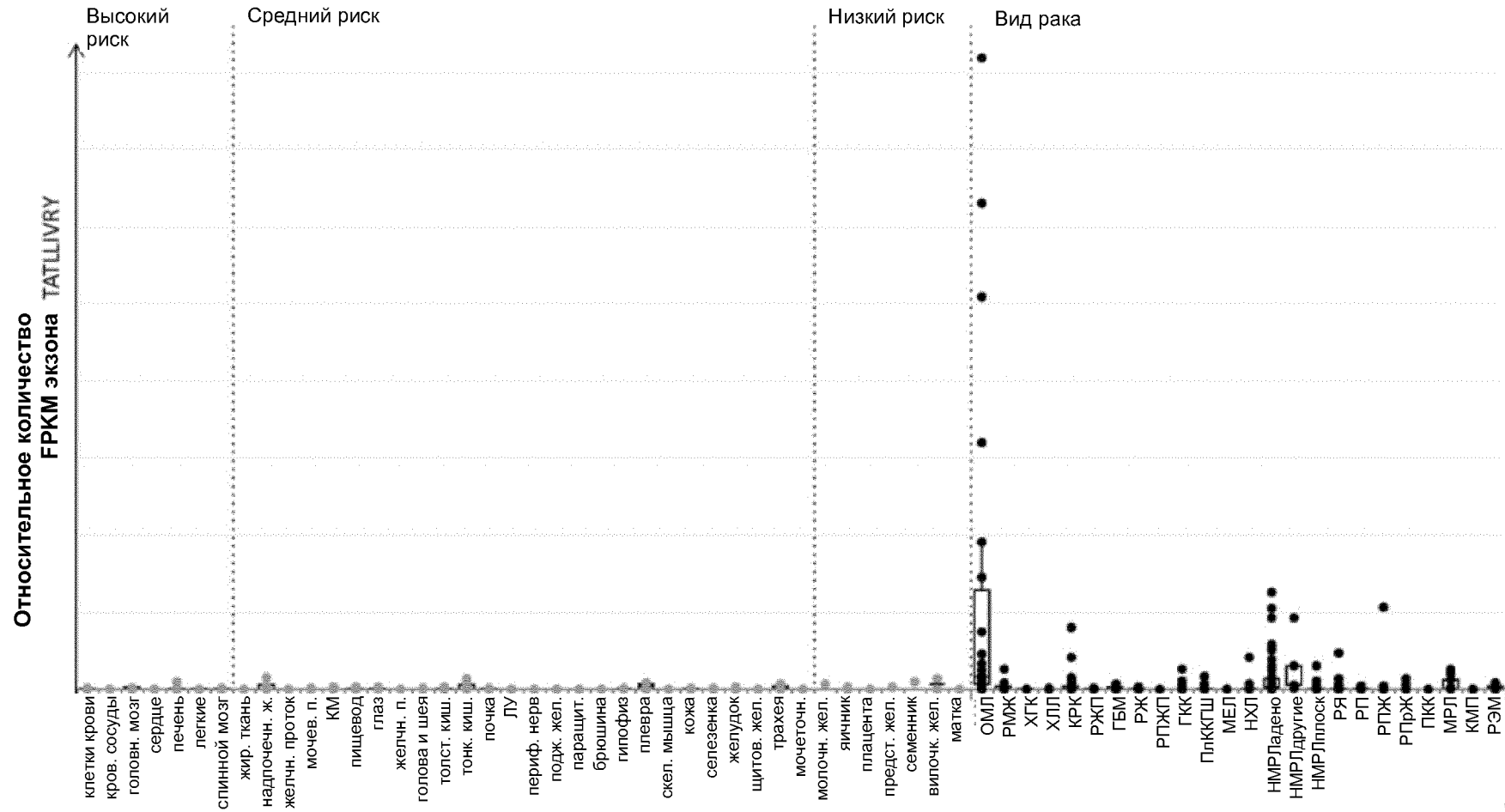


Фигура 20

Ген: UMODL1

Пептид: TATLLIVRY

SEQ ID NO: 96

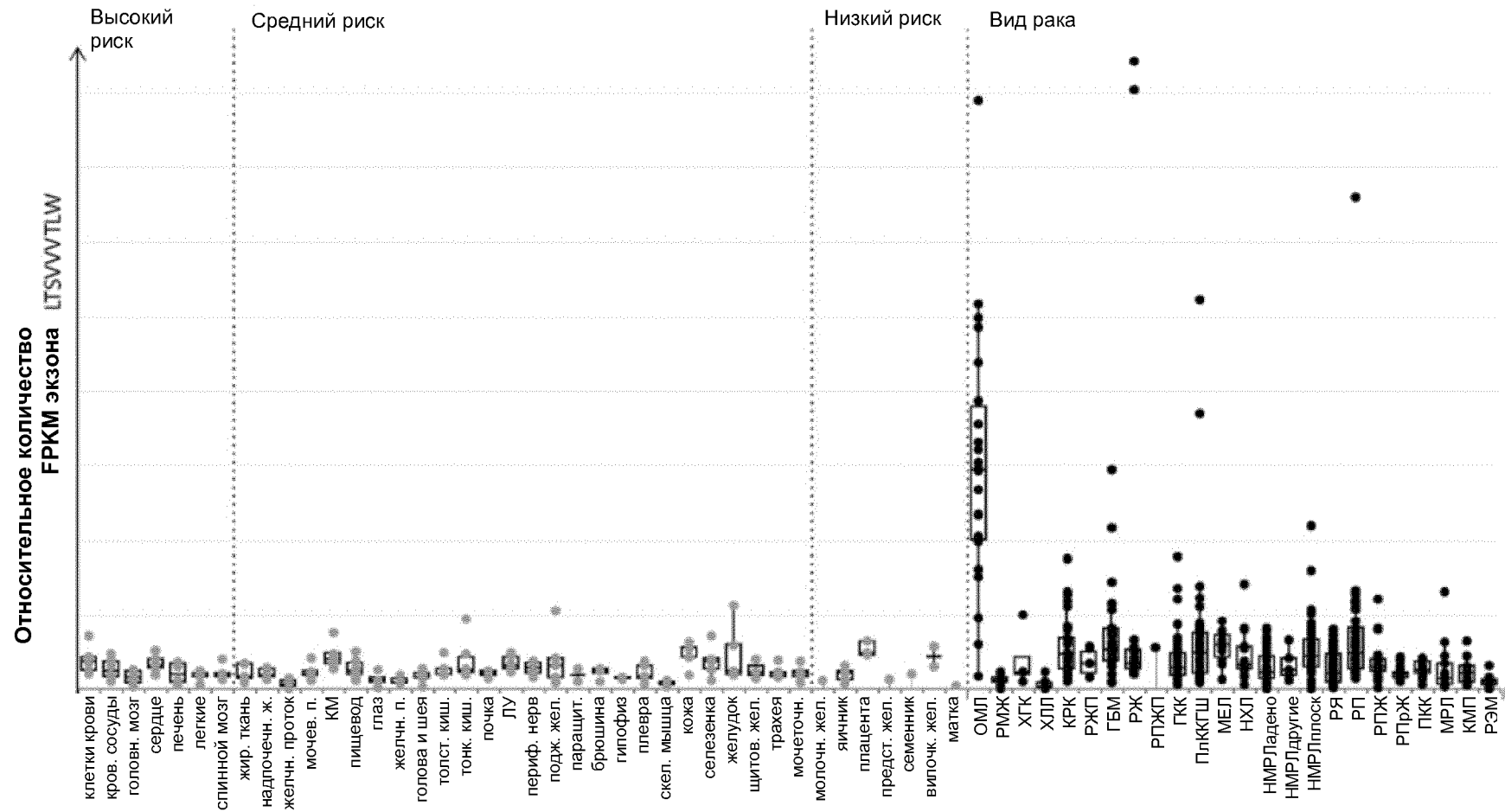


Фигура 2Р

Ген: CDK6

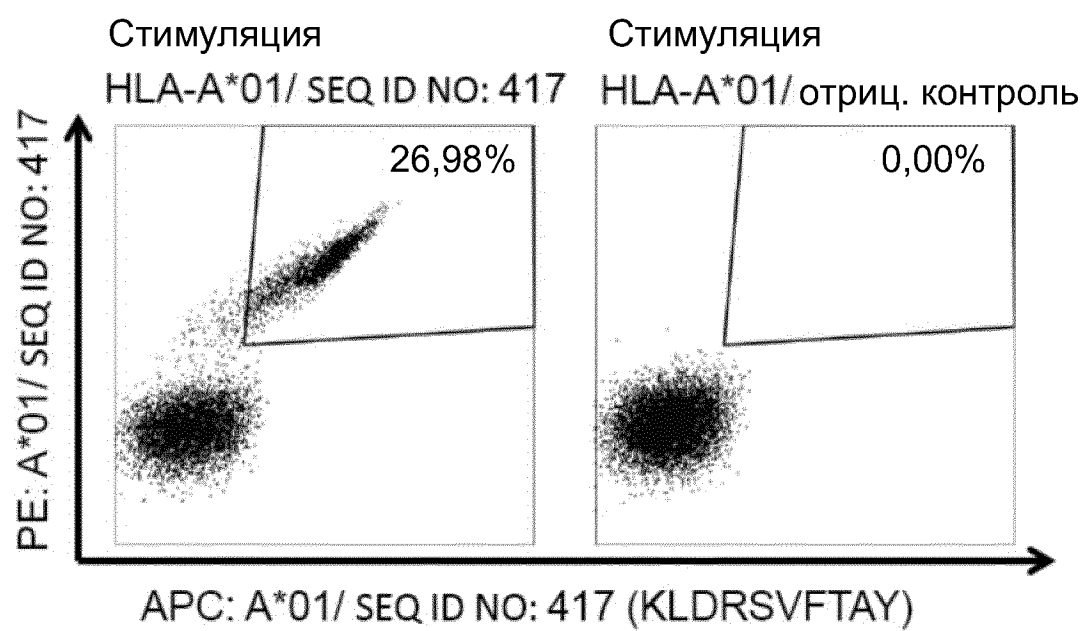
Пептид: LTSVVVTLW

SEQ ID NO: 374

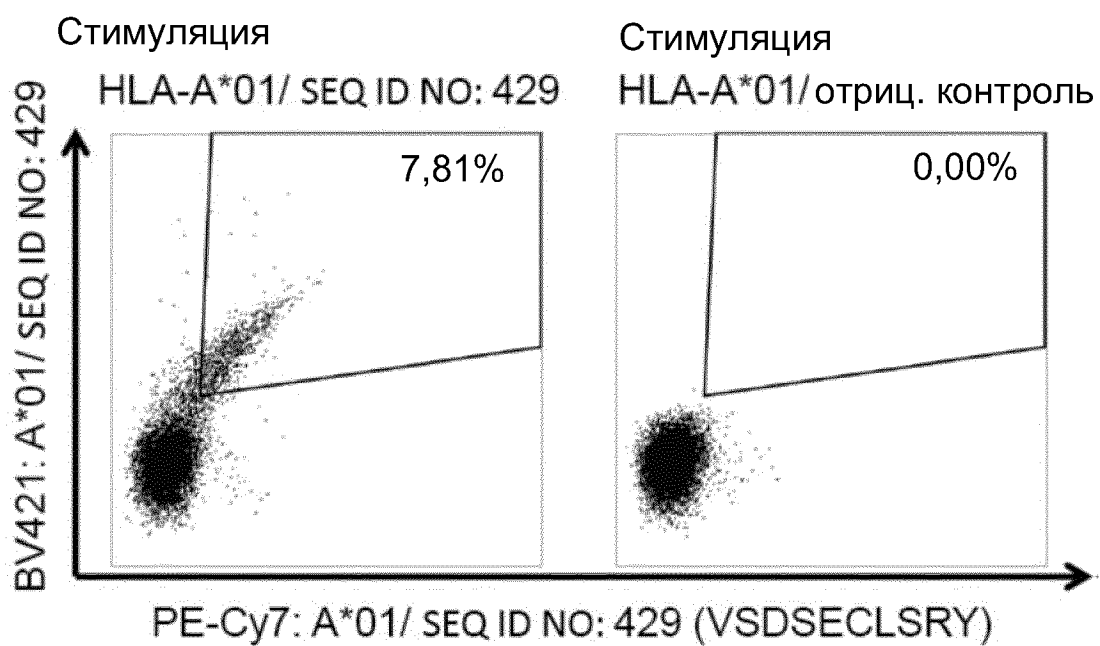


Фигура 3:

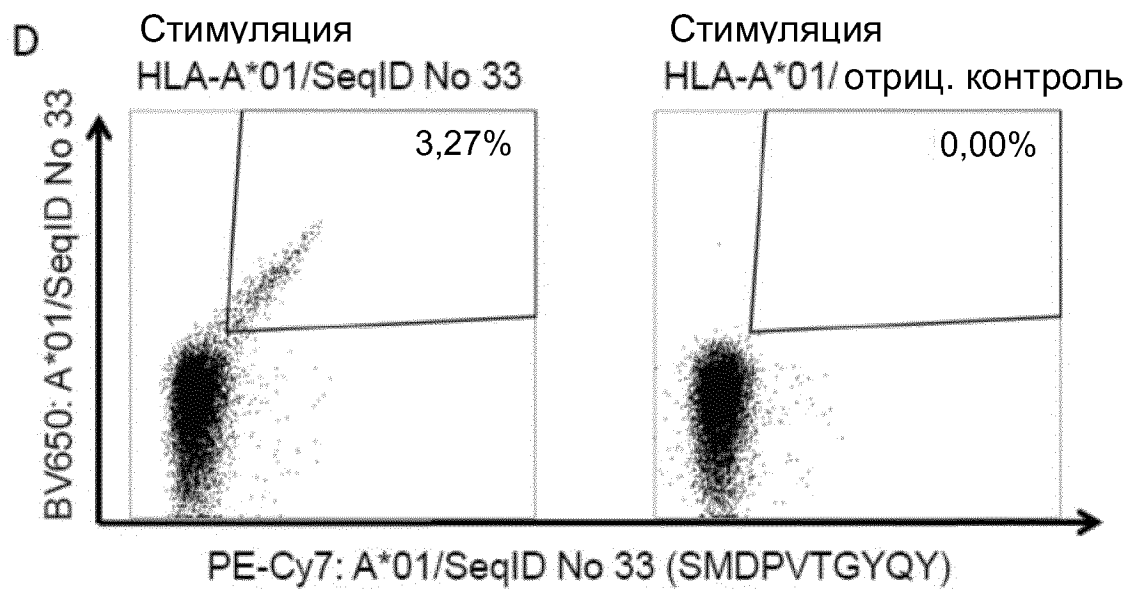
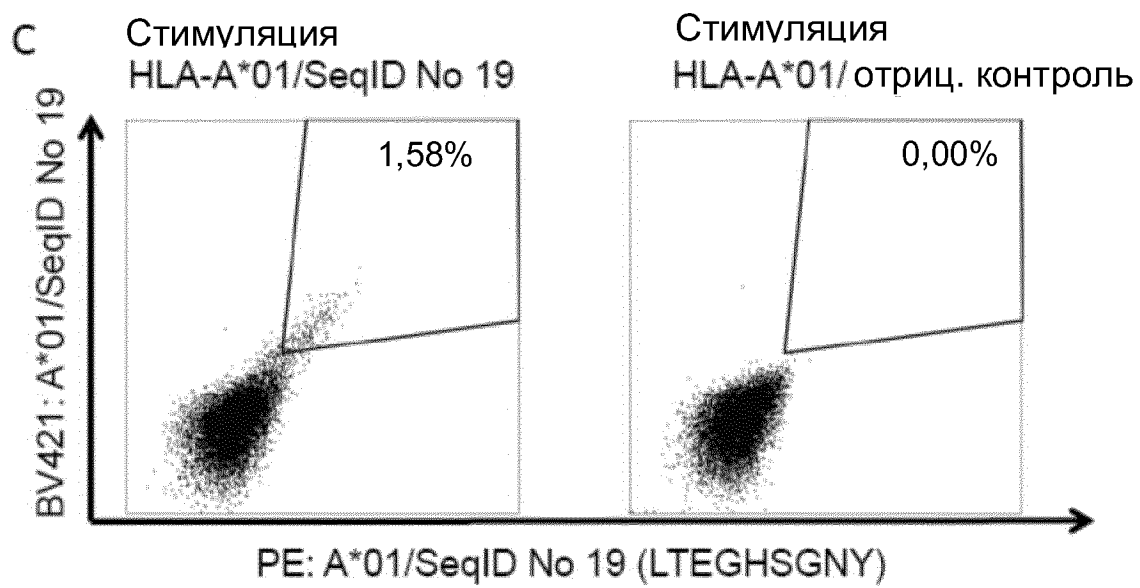
А



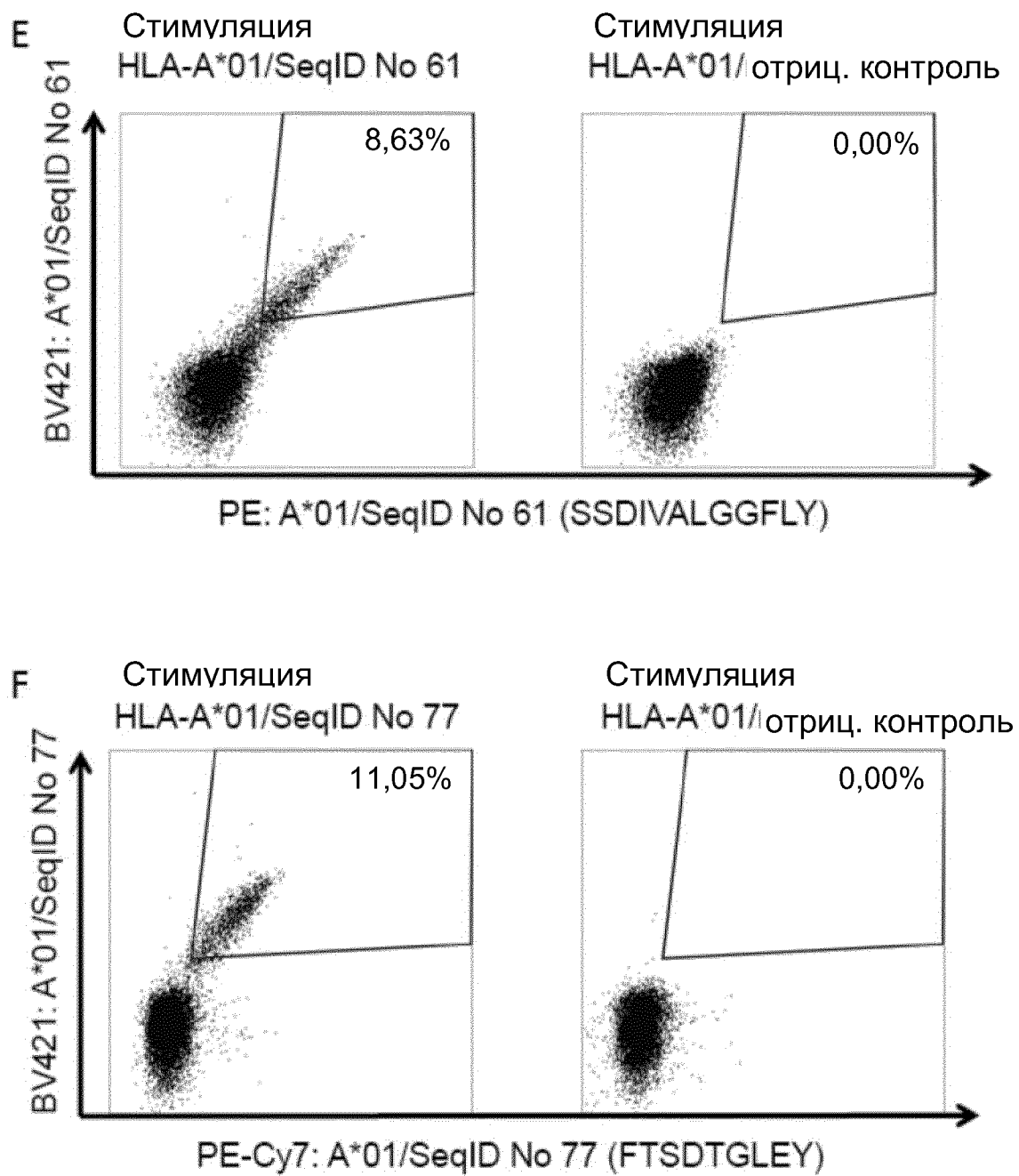
В



Фигура 3 (продолжение)



Фигура 3 (продолжение)



Фигура 3 (продолжение)

