



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123392** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	a 2017 07771	(73) Володілець (володільці):	ІММАТІКС БІОТЕКНОЛОДЖІС ГМБХ , Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany (DE)
(22) Дата подання заявки:	17.03.2016	(74) Представник:	Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	01.04.2021	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2009015842 A2, 05.02.2009 WO 2011113819 A2, 22.09.2011 WO 2004050858 A2, 17.06.2004 US 2014065620 A1, 06.03.2014 WO 03010327 A2, 06.03.2003 EP 1760089 A1, 07.03.2007 WO 2004030615 A2, 15.04.2004 WO 9511972 A1, 04.05.1995 WO 2015018805 A1, 12.02.2015 Integrated Functional Genomics Approach for the Design of Patient-individual Antitumor Vaccines / Weinschenk T., Gouttefangeas C., Schirle M. et al. // Cancer Research. – 2002. - Vol. 62. - P. 5818–5827 Laminin-5γ-2 (LAMC2) is highly expressed in anaplastic thyroid carcinoma and is associated with tumor progression, migration, and invasion by modulating signaling of EGFR / Garg M., Kanojia D., Okamoto R. et al. // Journal of clinical endocrinology and metabolism. – 2014. - Vol. 99(1). - P. E62–E72
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	1504502.4, 62/134,253		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	17.03.2015, 17.03.2015		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	GB, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	26.12.2017, Бюл.№ 24		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	31.03.2021, Бюл.№ 13		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2016/055817, 17.03.2016		
(72) Винахідник(и): Вайншенк Тоні (DE), Фрітше Йенс (DE), Зінгх Харпреет (US), Мар Андреа (DE), Отт Мартіна (DE), Вагнер Клаудія (DE), Шор Олівер (DE)			

(54) ПЕПТИД, ЗДАТНИЙ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З МОЛЕКУЛОЮ ГОЛОВНОГО КОМПЛЕКСУ ГІСТОСУМІСНОСТІ (МНС) ЛЮДИНИ І КЛАСУ, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ

(57) Реферат:

Винахід стосується пептиду, який здатний зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини І класу. Також винахід стосується нуклеїнової кислоти, рекомбінантної клітини-хазяїна, способу отримання пептиду, активованої Т-клітини,

UA 123392 C2

застосування пептиду у виробництві лікарського засобу для лікування раку, терапевтичного комплексу та фармацевтичної композиції.

Цей винахід стосується пептидів, білків, нуклеїнових кислот та клітин для їх застосування в імунотерапії. Зокрема, цей винахід стосується імунотерапії раку. Цей винахід також стосується епітопів пухлино-асоційованих пептидів Т-клітин, які самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованими пептидами можуть, наприклад, служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні відповіді, або стимулювати Т-клітини *ex vivo* і переносити їх в організм пацієнта. Пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС), або пептиди як такі можуть також бути мішенями для антитіл, розчинних Т-клітинних рецепторів та інших зв'язувальних молекул.

Цей винахід стосується декількох нових пептидних послідовностей та їх варіантів, отриманих із молекул HLA I класу пухлинних клітин людини, які можуть застосовуватися у вакцинних композиціях з метою викликати протипухлинну імунну відповідь або являють собою мішені для розробки фармацевтично або імунологічно активних сполук і клітин.

Передумова створення винаходу

Рак підшлункової залози є одним із найбільш агресивних і летальних видів раку в усьому світі. У 2012 році він став дванадцятим за поширеністю видом раку у чоловіків із 178 000 випадками і одинадцятим за поширеністю видом раку у жінок із 160 000 випадками у масштабах всього світу. У тому ж році повідомлялося про 330 000 смертей, що вивело рак підшлункової залози на сьоме місце серед причин смерті від ракових захворювань (World Cancer Report, 2014).

Рак підшлункової залози не є одним видом ракового захворювання. Треба розрізнявати декілька чітко визначених підтипів. Ендокринні пухлини становлять приблизно 95 % від усіх випадків раку підшлункової залози і включають протокові і ацинозні аденокарциноми, інтрадуктальні папілярно-муцинозні неоплазми, солідні псевдопапілярні пухлини, муцинозні кістозні аденоми і серозні цистаденоми. 5 %, що залишилися від усіх випадків раку підшлункової залози, належать до підгрупи нейроендокринних пухлин підшлункової залози (World Cancer Report, 2014).

Інфільтруюча протокова аденокарцинома є найагресивнішою формою раку підшлункової залози, і завдяки її поширеності (90 % від усіх випадків раку підшлункової залози) епідеміологічні дані головним чином стосуються цього конкретного підтипу (World Cancer Report, 2014).

У 2012 році 68 % нових випадків було зареєстровано у розвинених країнах з найвищим показником захворюваності у центральній і Східній Європі, Північній Америці, Аргентині, Уругваю і Австралії. Навпаки, у більшості країн Африки і Східної Азії спостерігаються низькі показники захворюваності. У масштабах всього світу показники захворюваності, зважаючи на все, є доволі стабільними у часі для обох статей (World Cancer Report, 2014).

За відсутності специфічних симптомів рак підшлункової залози звичайно діагностується на пізній стадії і часто вже на стадії метастазування. Прогноз на момент встановлення діагнозу вкрай несприятливий, з 5-річною виживаністю 5 % і співвідношенням смертності і захворюваності 0,98 (World Cancer Report, 2014).

Як повідомлялося, ризик розвитку раку підшлункової залози підвищується під впливом декількох факторів, включаючи літній вік, оскільки у більшості пацієнтів він перевищує 65 років в момент встановлення діагнозу, і расова приналежність, оскільки у США афроамериканці мають у 1,5 рази вищий ризик у порівнянні з європеоїдною популяцією. Додатковий ризик становлять паління сигарет, надмірна вага, цукровий діабет, група крові ABO, що не є I (O) групою, панкреатит і випадки раку підшлункової залози у сімейній історії (World Cancer Report, 2014).

До 10 % випадків раку підшлункової залози вважаються такими, що пов'язані з сімейною історією цього захворювання. Гермінальні мутації у наступних генах асоціюються з підвищеним ризиком розвитку раку підшлункової залози: p16/CDKN2A, BRCA2, PALB2, PRSS1, STK11, ATM і генах системи корекції помилок спарювання основ у ДНК. Крім цього, спорадичні випадки раку підшлункової залози також характеризуються мутаціями у різних онкогенах і генах-супресорах пухлин. Найбільш поширені мутації у випадках протокової аденокарциноми відбуваються усередині онкогенів KRAS (95 %) і AIB1 (аж до 60 %) і генах-супресорах пухлин TP53 (75 %), p16/CDKN2A (95 %) і SMAD4 (55 %) (World Cancer Report, 2014).

Варіанти лікування пацієнтів з раком підшлункової залози дуже обмежені. Однією з головних проблем ефективності лікування є зазвичай пізня стадія розвитку пухлини під час встановлення діагнозу. Крім того, рак підшлункової залози є досить резистентним до хіміотерапевтичних препаратів, що може бути викликаним щільною і гіповаскулярною десмопластичною стромою пухлини.

Відповідно до рекомендацій, виданих Німецьким онкологічним товариством, Німецьким онкологічним фондом і Федеральною медичною асоціацією Німеччини, резекція пухлини є єдиним наявним варіантом радикального лікування. Резекція рекомендована у випадку, якщо пухлина обмежена підшлунковою залозою або якщо метастази обмежені прилеглими органами.

5 Резекція не рекомендована у випадку, якщо пухлина поширилася на віддалені органи. Резекція супроводжується ад'ювантною хіміотерапією гемцитабіном або 5-фторурацилом +/- лейковорин протягом шести місяців (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Пацієнтів з неоперабельними пухлинами на пізніх стадіях можна лікувати комбінацією хіміотерапії з радіохіміотерапією (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

10 Стандартним режимом паліативної хіміотерапії є прийом гемцитабіну, як монотерапії або в комбінації з інгібітором тирозинкіназних рецепторів епідермального фактору росту (EGF) ерлотинібом. Альтернативними варіантами є комбінація 5-фторурацилу, лейковорину, іринотекану і оксаліплатину, також відома під назвою протоколу FOLFIRINOX, або комбінація гемцитабіну з наб-паклітакселом, яка, як було показано у випробуванні MPACT, має кращий

15 ефект у порівнянні з монотерапією гемцитабіном (Von Hoff et al., 2013; S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Високе співвідношення смертності і захворюваності віддзеркалює нагальну потребу впровадження ефективніших терапевтичних стратегій в лікування раку підшлункової залози.

20 Засоби таргетної терапії, які виявилися ефективними у лікуванні ряду інших ракових захворювань, являють собою багатообіцяючий варіант. У зв'язку з цим було проведено декілька досліджень з метою оцінки користь від застосування засобів таргетної терапії для лікування поширеного раку підшлункової залози, на жаль, із дуже обмеженим успіхом (Walker and Ko, 2014). Тим не менш, генетична різноманітність захворювання на рак підшлункової залози може надати можливість застосування персоналізованої терапії: як було показано у випадку

25 інвазивної протокової аденокарциноми з біалельною інактивацією BRCA2 або PALB2, вона більш чутлива до лікування інгібіторами полі(АДФ-рибозо)полімерази і мітоміцином C (World Cancer Report, 2014).

Націлювання на строму пухлини становить альтернативний підхід до розробки нових лікарських засобів для раку підшлункової залози. Зазвичай щільна і гіповаскулярна строма може відігравати роль бар'єра для хіміотерапевтичних засобів. Було показано, що вона доставляє сигнали, які сприяють проліферації і інвазії пухлини і підтримці ракових стовбурових клітин. Таким чином, різні доклінічні і клінічні випробування мали на меті проаналізувати ефект виснаження і інактивації функцій клітин строми (Rucki and Zheng, 2014).

35 Вакцинаційні стратегії досліджувалися як додаткова інноваційна і багатообіцяюча альтернатива при лікуванні раку підшлункової залози. Вакцини на основі пептидів, націлені на мутації гену KRAS, активна теломераза, гастрин, сурвівін, CEA і MUC1, уже пройшли оцінку в клінічних випробуваннях, були отримані деякі багатообіцяючі результати. Більш того, клінічні випробування вакцин на основі дендритних клітин, аlogenних вакцин на основі клітин, що секретують ГМ-КСФ, і альгенпантуселю-L, за участю пацієнтів із раком підшлункової залози, також виявили користь від імунотерапії. У додаткових клінічних випробуваннях зараз

40 проводиться подальше дослідження ефективності протоколів введення різних вакцин (Salman et al., 2013).

Зважаючи на важкі побічні ефекти і витрати, пов'язані з лікуванням раку, існує потреба ідентифікувати фактори, які можливо буде використовувати для лікування раку взагалі і раку підшлункової залози зокрема. Є також потреба в ідентифікації інших чинників, які виконують роль біомаркерів раку взагалі і раку підшлункової залози зокрема, які забезпечать кращу діагностику раку, оцінку прогнозу і передбачення успіху лікування.

Імунотерапія раку являє собою варіант специфічного націлювання на ракові клітини, у той же час зводячи до мінімуму побічні ефекти. У імунотерапії раку використовується існування

50 пухлино-асоційованих антигенів.

Сучасна класифікація пухлино-асоційованих антигенів (ТАА) охоплює наступні головні групи:

а) Раково-тестикулярні антигени: Перші будь-коли ідентифіковані ТАА, які можуть бути розпізнані Т-клітинами, належать до цього класу, які були спочатку названі раково-тестикулярними (СТ) антигенами завдяки експресії його представників у гістологічно різних

55 пухлинах людини і, поряд із нормальними тканинами, тільки в сперматocyтах/сперматогоніальних клітинах яєчок і іноді в плаценті. Оскільки клітини яєчок не експресують молекули HLA I та II класу, ці антигени не можуть розпізнаватися Т-клітинами у нормальних тканинах і можуть, таким чином, вважатися пухлинно-специфічними, з точки зору імунології. Добре відомими прикладами СТ антигенів є члени сімейства MAGE і NY-ESO-1.

б) Антигени диференціації: Ці TAA розподілені між пухлинами та нормальними тканинами, з яких виникла пухлина. Більшість з відомих антигенів диференціації знайдена в меланомах і нормальних меланоцитах. Багато цих білків, пов'язаних із диференціацією у меланоцити, беруть участь у біосинтезі меланіну і тому не є пухлино-специфічними, але, тим не менше, широко застосовуються для імунотерапії раку. Приклади включають, без обмеження, тирозиназу і Melan-A/MART-1 для меланоми або ПСА для раку передміхурової залози.

в) Надмірно експресовані TAA: Гени, що кодують TAA, які широко експресуються, були виявлені в гістологічно різних типах пухлин, а також у багатьох нормальних тканинах, загалом з нижчими рівнями експресії. Можливо, що багато епітопів, що були процесовані і, можливо, презентовані нормальними тканинами, присутні у кількості, що нижча за пороговий рівень розпізнання Т-клітинами, в той час як їх надекспресія в пухлинних клітинах може запустити антиракову реакцію, порушивши раніш встановлену толерантність. Відомими прикладами для цього класу TAA є Her-2/neu, сурвівін, теломераза або WT1.

г) Пухлино-специфічні антигени: Ці унікальні TAA утворюються в результаті мутацій нормальних генів (таких як бета-катенін, CDK4 тощо). Деякі з цих молекулярних змін зв'язані з неопластичною трансформацією і (або) прогресуванням пухлини. Пухлино-специфічні антигени загалом можуть викликати сильні імунні відповіді, не спричиняючи ризику аутоімунних реакцій проти нормальних тканин. З іншого боку, ці TAA у більшості випадків мають відношення тільки до певної пухлини, на якій вони були ідентифіковані, і зазвичай не є спільними для багатьох окремих пухлин. Специфічність пептиду до пухлини (або асоціація з пухлиною) може також виникати, якщо пептид походить із екзону пухлини (пухлино-асоційованого екзону) у випадку білків з пухлиноспецифічними (-асоційованими) ізоформами.

д) TAA, що виникають в результаті посттрансляційних модифікацій: Такі TAA можуть виникати з білків, які не є ні специфічними, ні надмірно експресованими у пухлинах, але, незважаючи на це, стають асоційованими з пухлинами в результаті посттрансляційних процесів, первинно активних у пухлинах. Прикладами TAA цього класу є антигени, що виникають в результаті змін характеру глікозилювання, що приводить до утворення у пухлинах нових епітопів, таких як MUC1, або таких подій як білковий сплайсинг під час деградації, які можуть бути пухлино-специфічними, а можуть і не бути.

е) Онковірусні білки: Ці TAA є вірусними білками, які можуть відігравати вирішальну роль в онкогенному процесі і, оскільки вони є чужорідними (не походять від людини), вони можуть викликати відповідь Т-клітин. Прикладами таких білків є білки вірусу папіломи людини типу 16, E6 і E7, які експресуються клітинами карциноми шийки матки.

Мішенями імунотерапії з використанням Т-клітин є пептидні епітопи, отримані з пухлино-асоційованих або пухлино-специфічних білків, які презентуються молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС). Антигенами, які розпізнаються пухлино-специфічними Т-лімфоцитами, тобто їхніми епітопами, можуть бути молекули, що отримані з усіх класів білків, таких як ферменти, рецептори, фактори транскрипції тощо, які експресуються і, у порівнянні з незміненими клітинами того ж походження, активність яких підвищена у клітинах відповідної пухлини.

Існує два класи молекул МНС, МНС I класу і МНС II класу. Молекули МНС I класу складаються з альфа-важких ланцюгів і бета-2-мікроглобуліну, молекули МНС II класу складаються з альфа- і бета-ланцюгів. Їхня тримірна конформація приводить до утворення зв'язувальної щілини, що використовується для нековалентної взаємодії з пептидами.

Молекули МНС I класу можна виявити в більшості клітин, що мають ядро. Вони презентують пептиди, які утворюються в результаті розщеплення протеолітичними ферментами переважно ендогенних білків, дефектних рибосомальних продуктів (DRIP) та більш великих пептидів. Однак пептиди, одержані з ендосомальних компартментів чи екзогенних джерел, також часто зустрічаються на молекулах МНС I класу. Цей неklasичний спосіб презентації I класом називається у науковій літературі крос-презентацією (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Молекули МНС II класу містяться головним чином на професійних антигенпрезентуючих клітинах (АПК) і презентують головним чином пептиди екзогенних або трансмембранних білків, які поглинаються АПК в ході ендоцитозу і згодом процесуються.

Комплекси пептидів і молекул МНС I класу розпізнаються CD8-позитивними Т-клітинами, що несуть відповідний Т-клітинний рецептор (ТКР), в той час як комплекси пептиду і молекул МНС II класу розпізнаються CD4-позитивними Т-хелперами, що несуть відповідний ТКР. Загальновідомо, що ТКР, пептид і МНС, таким чином, є присутніми у стехіометричних кількостях у співвідношенні 1:1:1.

CD4-позитивні Т-хелпери відіграють важливу роль, викликаючи та підтримуючи ефективну відповідь CD8-позитивних цитотоксичних Т-клітин. Ідентифікація епітопів CD4-позитивних Т-

клітин, отриманих із пухлино-асоційованих антигенів (ТАА), може мати велике значення під час розробки фармацевтичних засобів для ініціювання протипухлинних імунних реакцій (Gnjatic et al., 2003). У місці локалізації пухлини Т-хелперні клітини підтримують сприятливе для цитотоксичних Т-клітин (ЦТЛ) цитокінове середовище (Mortara et al., 2006) і притягують ефекторні клітини, такі як ЦТЛ, природні кілерні (NK) клітини, макрофаги і гранулоцити (Hwang et al., 2007).

За відсутності запалення експресія молекул МНС II класу обмежується головним чином клітинами імунної системи, особливо професійними антиген-презентуючими клітинами (АПК), наприклад, моноцитами, клітинами, що походять з моноцитів, макрофагами, дендритними клітинами. Було виявлено, що клітини пухлин у хворих на рак пацієнтів експресують молекули МНС II класу (Dengjel et al., 2006).

Подовжені (довші) пептиди за винаходом можуть діяти як епітопи, активні по відношенню до молекул МНС II класу.

Т-хелперні клітини, активовані зв'язаними з молекулами МНС II класу епітопами, відіграють важливу роль в регуляції ефекторної функції ЦТЛ у протипухлинному імунитеті. Епітопи Т-хелперних клітин, які ініціюють реакцію Т-хелперів типу TH1, підтримують ефекторні функції CD8-позитивних Т-кілерів, котрі включають цитотоксичні функції, спрямовані проти клітин пухлини, що презентують комплекси пухлино-асоційованого пептиду/МНС на поверхнях своїх клітин. У такий спосіб епітопи пухлино-асоційованих пептидів Т-хелперів самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованих пептидами можуть служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції.

На моделях тварин-ссавців, наприклад, на мишах, було показано, що навіть за відсутності CD8-позитивних Т-лімфоцитів, присутності CD4-позитивних Т-клітин виявляється достатньо для послаблення клінічних проявів пухлин шляхом інгібування ангиогенезу за рахунок секреції інтерферону-гамма (ІФН-γ) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Існують докази, що Т-клітини є ефекторними клітинами прямої протипухлинної дії (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Оскільки конститутивна експресія молекул HLA II класу зазвичай обмежується клітинами імунної системи, раніше вважалось неможливим виділити пептиди II класу безпосередньо з первинних пухлин. Однак Dengjel і співавт. вдалося ідентифікувати декілька зв'язаних з молекулами МНС II класу епітопів безпосередньо із пухлин (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Оскільки обидва типи відповіді, залежні від CD8 та CD4, спільно та синергічно роблять свій внесок у протипухлинну дію, для розробки протипухлинних вакцин важливими є ідентифікація та визначення характеристик пухлино-асоційованих антигенів, які розпізнаються або CD8+Т-клітинами (ліганд: молекули МНС I класу + пептидний епітоп), або CD4- позитивними Т-хелперними клітинами (ліганд: молекули МНС II класу + пептидний епітоп).

Щоб пептид, зв'язаний з молекулою МНС I класу, ініціював (викликав) клітинну імунну відповідь, він також має зв'язатися з молекулою МНС. Цей процес залежить від алеля молекули МНС і специфічних поліморфізмів амінокислотної послідовності пептиду. Пептиди, що зв'язуються з молекулами МНС I класу, зазвичай мають 8-12 амінокислотних залишків у довжину і зазвичай містять два консервативні залишки ("якорі") у своїй послідовності, які взаємодіють з відповідною зв'язувальною щільною молекулою МНС. У такий спосіб кожний алель МНС має "зв'язувальний мотив", що визначає, які пептиди зможуть специфічно зв'язатися зі зв'язувальною щільною.

В імунній реакції, залежній від молекул МНС I класу, пептиди не тільки мають бути здатними зв'язатися з певними молекулами МНС I класу, що експресуються клітинами пухлини, але вони також мають розпізнаватися Т-клітинами, що несуть специфічний Т-клітинний рецептор (ТКР).

Для того, щоб білки розпізнавалися Т-лімфоцитами як пухлино-специфічні або пухлино-асоційовані антигени, та щоб їх було можливо застосовувати в терапії, необхідно створити особливі передумови. Антиген має експресуватися, головним чином, пухлинними клітинами і не експресуватися або експресуватися у порівняно невеликих кількостях нормальними здоровими тканинами. В переважному втіленні вищезгаданий пептид має надмірно презентуватися пухлинними клітинами у порівнянні з нормальними здоровими тканинами. До того ж бажано, щоб відповідний антиген не тільки був присутнім у пухлині певного типу, але також був присутнім у високих концентраціях (тобто як декілька копій відповідного пептиду на клітину). Пухлино-специфічні та пухлино-асоційовані антигени часто отримують із білків, які беруть безпосередню участь у трансформації нормальної клітини в пухлинну клітину, завдяки їх функції, наприклад, в контролі клітинного циклу або пригніченні апоптозу. Крім цього, низхідні мішені білків, що також є безпосередньою причиною трансформації, можуть мати підвищену

експресію і, таким чином, можуть бути опосередковано пухлино-асоційованими. Такі опосередковано пухлино-асоційовані антигени також можуть бути мішенями у вакцинаційному підході (Singh-Jasuja et al., 2004). Важливим є те, щоб в амінокислотній послідовності антигену були присутні епітопи, оскільки такий пептид ("імуногенний пептид"), отриманий із пухлино-асоційованого антигену, має приводити до відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

По суті, будь-який пептид, що здатний зв'язуватися з молекулою МНС, може відігравати роль епітопу Т-клітини. Передумовою індукції відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo* є присутність Т-клітин із відповідним ТКР і відсутність імунологічної толерантності до цього конкретного епітопу.

Таким чином, ТАА є стартовою точкою для розробки Т-клітинної терапії, включаючи, але не обмежуючись ними, протипухлинні вакцини. Методи ідентифікації та визначення характеристик ТАА зазвичай базуються на використанні Т-клітин, які можна виділити з організму пацієнтів або здорових суб'єктів, або вони ґрунтуються на генерації різних профілів транскрипції або різному характері експресії пептидів тканинами пухлин і нормальними тканинами. Проте ідентифікація генів, які надмірно експресуються в пухлинних тканинах або лініями пухлинних клітин людини, або селективно експресуються в таких тканинах або клітинних лініях, не дає точної інформації щодо використання антигенів, що кодується цими генами, в імунній терапії. Причиною цього є те, що тільки окрема субпопуляція епітопів цих антигенів придатна для такого застосування, оскільки має бути присутня Т-клітина з відповідним ТКР, і імунологічна толерантність по відношенню до цього епітопу повинна бути відсутньою або мінімальною. Отже, у більш переважному втіленні цього винаходу важливо вибрати тільки ті надмірно або селективно презентовані пептиди, проти яких можна знайти функціонуючу Т-клітину і (або) Т-клітину, здатну до проліферації. Така функціонуюча Т-клітина визначається як Т-клітина, яка за стимуляції специфічним антигеном може бути клонована і здатна виконувати функції ефектору ("ефекторна Т-клітина").

У випадку націлювання специфічних ТКР (наприклад, розчинних ТКР) і антитіл або інших зв'язувальних молекул (каркасів) за цим винаходом імуногенність базових пептидів є вторинною. У цих випадках визначальним фактором є презентація

Коротке формулювання суті винаходу

Згідно з першим аспектом цього винаходу, пропонується пептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або варіант його послідовності, який принаймні на 77 %, переважно принаймні на 88 % гомологічний (переважно принаймні на 77 % або принаймні на 88 % ідентичний) послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67, де згаданий варіант зв'язується з МНС і (або) викликає перехресну реакцію Т-клітин із згаданим пептидом або його фармацевтично прийнятною сіллю, де згаданий пептид не є базовим повнорозмірним поліпептидом.

Цей винахід також стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або його варіант, який принаймні на 77 %, переважно принаймні на 88 % гомологічний (переважно принаймні на 77 % або принаймні на 88 % ідентичний) послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину між 8 і 100, переважно між 8 і 30 і найбільш переважно між 8 і 14 амінокислот.

У нижче наведеній таблиці описані пептиди за цим винаходом, їх відповідні SEQ ID NO і очікувані вихідні (основні) гени для пептидів. Усі пептиди у Таблиці 1 і Таблиці 2 зв'язуються з HLA-A*02. Пептиди Таблиці 2 були розкриті раніше у великих списках як результати високопродуктивного скринінгу з великою частотою помилок або були розраховані з використанням алгоритмів, але їхній зв'язок з раковими захворюваннями взагалі не був встановлений. Пептиди Таблиці 3 є додатковими пептидами, які доцільно використовувати у комбінації з іншими пептидами за винаходом. Наведені у Таблицях 4 і 4-2 пептиди також можуть використовуватися в діагностиці і (або) лікуванні різних інших злоякісних пухлин, пов'язаних з надмірною експресією або надмірною презентацією відповідного базового поліпептиду.

Таблиця 1

Пептиди за цим винаходом

SEQ ID No.	Послідовність	Ідентифікатор(-и) гена	Символ гена (символи генів)
1	FLAQQESEI	1211, 1212	CLTA, CLTB
2	SLQEEHVAVA	5339	PLEC
3	ALLTFMEQV	165	AEBP1
4	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
5	LLVDDSFLHTV	253982	ASPHD1
6	VLISLKQAPLV	1211	CLTA
7	AQQESEIAGI	1211, 1212	CLTA, CLTB
8	IVDDLTINL	1303	COL12A1
9	FLFDGSANLV	1293	COL6A3
10	FLVDGSSAL	1293	COL6A3
11	FLYKIIDEL	1293	COL6A3
12	FVSEIVDTV	1293	COL6A3
13	LLAGQTYHV	1293	COL6A3
14	VLAKPGVISV	1293	COL6A3
15	SLANNVTSV	131566	DCBLD2
16	APVNVTTTEVKSV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
17	FLKSGDAIV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
18	SLLDDELMSEL	26088	GGA1
19	HLAPETDEDDL	8100	IFT88
20	RLAGDGVGAV	3855	KRT7
21	HLMDQPLSV	3918	LAMC2
22	TLDGAAVNQV	3918	LAMC2
23	SLSAFTLFL	4060	LUM
24	GLLEELVTV	642475	MROH6
25	SLKEEVGEEAI	4627	MYH9
26	SLKEEVGEEAIV	4627	MYH9
27	YLQGQRLDNV	6447	SCG5
28	YLQGQRLDNVV	6447	SCG5
29	FLQEYLDAI	6317, 6318	SERPINB3, SERPINB4
30	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
31	SLAAAAGKQEL	6750	SST
32	SLAAAAGKQELA	6750	SST
33	SLDSRLELA	81628	TSC22D4
34	MLMPVHFLL	114131	UCN3
35	VMDSGDGVTHTV	100996820, 344227, 345651, 440915, 445582, 60, 641455, 653269, 653781, 71, 728378	ACTBL2, POTEKP, POTEI, ACTB, POTEJ, ACTG1, POTEJ, POTEI, POTEJ, ACTG1, POTEJ
36	KQEYDESGPSIVH	100996820, 344227, 440915, 445582, 60, 641455, 653269, 653781, 71, 728378	POTEKP, POTEI, ACTB, POTEJ, POTEI, POTEJ, ACTG1, POTEJ
37	GLLKKINSV	55107	ANO1
38	NLVEKTPALV	10632, 267020	ATP5L, ATP5L2
39	TLLSNLEEA	1191	CLU
40	FILDSAETTTL	1293	COL6A3
41	FLLDGSEGV	1293	COL6A3
42	KLVDKSTEL	1293	COL6A3
43	RLDQRVPQI	1293	COL6A3
44	VLLDKIKNLQV	1293	COL6A3
45	VADKIHVS	11072	DUSP14

Таблиця 2 (продовження)

SEQ ID No.	Послідовність	Ідентифікатор(-и) гена	Символ гена (символи генів)
46	TFAPVNVTTTEVKS V	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
47	KMDASLGNLFA	10447, 51384	FAM3C, WNT16
48	ALTQTGGPHV	2316	FLNA
49	NLKGTFFATL	100187828, 3043, 3045	HBB, HBD
50	ALAAILTRL	80201	HKDC1
51	ALMLQGVDL	3329	HSPD1
52	RMVEEIGVEL	10525	HYOU1
53	SSFGLGGGSV	3880	KRT19
54	VLLSEIEVA	4134	MAP4
55	YLDAMMNEA	103910, 10627	MYL12B, MYL12A
56	GLLDYATGAIGSV	117583	PAR3B
57	FLGKVVIDV	100271927, 10156	RASA4B, RASA4
58	GLAAFKAFI	5999	RGS4
59	KLFNLSKEDDV	6194	RPS6
60	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
61	ALEKDYEEVGV	10376, 113457, 7278, 7846	TUBA1B, TUBA3D, TUBA3C, TUBA1A
62	ALEKDYEEV	10376, 113457, 51807, 7277, 7278, 7846, 84790	TUBA1B, TUBA3D, TUBA8, TUBA4A, TUBA3C, TUBA1A, TUBA1C
63	FAGDDAPR	100996820, 344227, 445582, 58, 59, 60, 653269, 653781, 70, 71, 72, 728378	POTEE, ACTA1, ACTA2, ACTB, POTEI, POTEJ, ACTC1, ACTG1, ACTG2, POTEF
64	FLVSNMLLAEA	113791	PIK3IP1

Таблиця 3

Додаткові пептиди за цим винаходом, щодо яких зв'язок з раковими захворюваннями не був встановлений

SEQ ID No.	Послідовність	Ідентифікатор(-и) гена	Символ гена (символи генів)
65	YLYDSETKNA	4316	MMP7
66	ALLSGLREA	23028	KDM1A
67	KMFFLIDKV	4599	MX1

Таблиця 4

Пептиди, які доцільно використовувати, наприклад, для персоналізованої терапії раку

SEQ ID No.	Послідовність	Ідентифікатор(-и) гена	Символ гена (символи генів)
68	KLLTEVHAA	101	ADAM8
69	VMAFPTMTI	338	APOB
70	FLVDGWSV	1303	COL12A1
71	FLLDGSANV	1293	COL6A3
72	YVYQNNIYL	2191	FAP
73	TLVAIVVGV	60681	FKBP10
74	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
75	RLDDLKMTV	3918	LAMC2
76	RLLDSVSRL	3918	LAMC2
77	GLTDNIHLV	25878	MXRA5
78	TLSSIKVEV	25878	MXRA5
79	VLAPRVLRA	5954	RCN1

Таблиця 5 (продовження)

SEQ ID No.	Послідовність	Ідентифікатор(-и) гена	Символ гена (символи генів)
80	TLYPHTSQV	1462	VCAN
81	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
82	SISDVIAQV	56172	ANKH
83	FLIDSSEGV	1293	COL6A3
84	NLLDLDYEL	1293	COL6A3
85	TVAEVIQSV	55083	KIF26B
86	SLLAQNTSWLL	7070	THY1
87	LLLGSPAAA	23544	SEZ6L

Цей винахід також загалом стосується пептидів за цим винаходом для застосування для лікування проліферативних захворювань, таких як, наприклад, рак легенів, рак нирки, рак головного мозку, рак товстої або прямої кишки, рак стравоходу, рак молочної залози, рак яєчника, рак шлунка, рак печінки, рак передміхурової залози, меланома і лейкоз.

Особливо переважними є пептиди – для застосування самостійно або в комбінації – за цим винаходом, вибрані з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67. Особливо переважними є пептиди – для застосування самостійно або в комбінації – за цим винаходом, вибрані з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 34 (див Таблиця 1), і їх застосовування в імунотерапії раку підшлункової залози, раку легенів, раку нирки, раку головного мозку, раку товстої або прямої кишки, раку стравоходу, раку молочної залози, раку яєчника, раку шлунка, раку печінки, раку передміхурової залози, меланоми і лейкозу, і переважно раку підшлункової залози. Як наведено далі у Таблицях 4 і 4-2, багато пептидів за цим винаходом також виявлені на пухлинах інших видів і можуть, таким чином, також застосовуватися в імунотерапії за іншими показаннями. Див. також Фігуру 1 і Приклад 1.

Таблиця 6. Пептиди за цим винаходом та їх конкретне застосування при лікуванні інших проліферативних захворювань, особливо інших ракових захворювань. Із таблиці видно, на яких додаткових видах пухлин вони були виявлені і демонструють надмірну презентацію на більш ніж 5 % досліджених зразків пухлин, або презентацію на більш ніж 5 % досліджених зразків пухлин зі співвідношенням середніх геометричних показників для пухлин і для нормальних тканин більшим ніж 3. Надмірна презентація визначається як більш висока презентація на зразку пухлини у порівнянні із зразком нормальної тканини з найвищим рівнем презентації.

Таблиця 7

SEQ ID No.	Послідовність	Інші відповідні органи / захворювання
3	ALLTFMEQV	Легеня, нирка, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, стравохід
4	SVDVSPPKV	Легеня, нирка, меланома
5	LLVDDSFHTV	Нирка, головний мозок, печінка, меланома, яєчник
8	IVDDLTLNL	Стравохід
9	FLFDGSANLV	Легеня, товста кишка, пряма кишка, молочна залоза, стравохід
10	FLVDGSSAL	Легеня, шлунок, молочна залоза
11	FLYKIIDEL	Легеня, товста кишка, пряма кишка, молочна залоза
12	FVSEIVDTV	Легеня, молочна залоза, стравохід
14	VLAKPGVISV	Легеня
15	SLANNVTSTV	Легеня, нирка, головний мозок, шлунок, меланома, яєчник, стравохід
16	APVNVTTVEKSV	Лейкоцити
21	HLMDQPLSV	Легеня
23	SLSAFTLFL	Легеня, передміхурова залоза
24	GLLEELVTV	Легеня, шлунок, яєчник
30	VVDEGPTGV	Легеня, нирка, головний мозок, шлунок, печінка, лейкоцити, молочна залоза, яєчник
34	MLMPVHFL	Шлунок
36	KQEYDESGPSIVH	Легеня, головний мозок

Таблиця 8 (продовження)

SEQ ID No.	Послідовність	Інші відповідні органи / захворювання
39	TLLSNLEEA	Головний мозок, передміхурова залоза
40	FILDSAETTTL	Легеня
41	FLLDGSEGV	Легеня, молочна залоза, яєчник, стравохід
42	KLVDKSTEL	Легеня, товста кишка, пряма кишка, стравохід
43	RLDQRVPI	Легеня, товста кишка, пряма кишка, молочна залоза, стравохід
44	VLLDKIKNLQV	Легеня, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, молочна залоза, меланома
45	VADKIHSV	Легеня, шлунок
47	KMDASLGNLFA	Головний мозок
50	ALAAILTRL	Нирка, шлунок, товста кишка, пряма кишка
51	ALMLQGVDL	Стравохід
53	SSFGLGGGSV	Легеня
55	YLDAMMNEA	Головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, яєчник
58	GLAAFKAF	Легеня, нирка, печінка
60	YLEEDVYQL	Легеня, нирка, товста кишка, пряма кишка, молочна залоза
64	FLVSNMLLAEA	Передміхурова залоза
65	YLYDSETKNA	Нирка, товста кишка, пряма кишка, печінка, яєчник, стравохід
66	ALLSGLREA	Нирка, лейкоцити, меланома
67	KMFFLIDKV	Головний мозок, печінка
68	KLLTEVHAA	Легеня, нирка, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, молочна залоза, яєчник
69	VMAFPTMTI	Легеня, печінка, передміхурова залоза, яєчник, стравохід
70	FLVDGWSV	Легеня, шлунок, товста кишка, пряма кишка, яєчник, стравохід
71	FLLDGSANV	Легеня, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, молочна залоза, яєчник, стравохід
72	YVYQNNIYL	Легеня, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, молочна залоза, меланома, яєчник, стравохід
73	TLVAIVGV	Легеня, нирка, головний мозок, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, передміхурова залоза, молочна залоза, яєчник, стравохід
74	KIQEILTQV	Легеня, нирка, головний мозок, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, лейкоцити, яєчник, стравохід
75	RLDDLKMTV	Легеня, нирка, товста кишка, пряма кишка, яєчник, стравохід
76	RLLDSVSR	Легеня, нирка, товста кишка, пряма кишка, печінка, яєчник
77	GLTDNIHLV	Легеня, нирка, товста кишка, пряма кишка, яєчник, стравохід
78	TLSSIKVEV	Легеня, нирка, шлунок, товста кишка, пряма кишка, передміхурова залоза, молочна залоза, меланома
79	VLAPRVLRA	Легеня, нирка, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка
81	AMSSKFFLV	Легеня, головний мозок, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, передміхурова залоза, стравохід
82	SISDVIAQV	Легеня, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, передміхурова залоза
83	FLIDSSEGV	Легеня, товста кишка, пряма кишка, молочна залоза, яєчник, стравохід
84	NLLDLDYEL	Легеня, шлунок, товста кишка, пряма кишка, молочна залоза, яєчник, стравохід
85	TVAEVIQSV	Легеня, стравохід
86	SLLAQNTSWLL	Легеня, нирка, головний мозок, шлунок, товста кишка, пряма кишка, меланома
87	LLLGSPAAA	Головний мозок

Таблиця 4-2. Пептиди за цим винаходом та їх конкретне застосування при лікуванні інших проліферативних захворювань, особливо інших ракових захворювань (поправка до Таблиці 4).
 5 Із таблиці видно, як і з Таблиці 4, на яких додаткових видах пухлин були виявлені вибрані пептиди, що демонструють надмірну презентацію (включаючи специфічну презентацію) на більш ніж 5 % досліджених зразків пухлин, або презентацію на більш ніж 5 % досліджених

зразків пухлин зі співвідношенням середніх геометричних показників для пухлин і для нормальних тканин більшим ніж 3. Надмірна презентація визначається як більш висока презентація на зразку пухлини у порівнянні із зразком нормальної тканини з найвищим рівнем презентації. Нормальними тканинами, у порівнянні з якими була досліджена надмірна презентація, були: жирова тканина, надниркова залоза, клітини крові, кровеносні судини, кістковий мозок, головний мозок, хрящ, стравохід, око, жовчний міхур, серце, нирки, товста кишка, печінка, легені, лімфатичний вузол, нервова тканина, підшлункова залоза, парацитоподібна залоза, очерешина, гіпофіз, плевра, слинна залоза, скелетні м'язи, тонка кишка, селезінка, шлунок, тимус, щитоподібна залоза, трахея, сечовід і сечовий міхур.

Таблиця 4-2

SEQ ID No.	Послідовність	Додаткові види пухлин
3	ALLTFMEQV	ДРЛ, РМЗ, меланома, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
4	SV DVSPPKV	Меланома, рак стравоходу
5	LLVDDSFLHTV	ДРЛ, РМЗ, меланома, рак стравоходу, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
6	VLISLKQAPLV	РМЗ, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
8	IVDDLTINL	НДРЛ, РШ, меланома, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ
9	FLFDGSANLV	ДРЛ, меланома, рак яєчника, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
10	FLVDGSSAL	ДРЛ, КРК, меланома, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
11	FLYKIIDEL	ДРЛ, меланома, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
12	FVSEIVDTV	ДРЛ, РШ, КРК, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
13	LLAGQTYHV	НДРЛ, РМЗ, РЯ, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
14	VLAKPGVISV	РМЗ, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
15	SLANNVTSV	Рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
16	APVNVTTTEVKS	ГМЛ
19	HLAPETDEDDL	Рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
20	RLAGDGVGAV	Рак сечового міхура
21	HLMDQPLSV	РЯ, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
22	TLDGAAVNQV	Рак стравоходу, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
23	SLSAFTLFL	ДРЛ, РМЗ, меланома, РЯ, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ
24	GLLEELVTV	ДРЛ, КРК, РМЗ, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
29	FLQEYLDAL	Рак сечового міхура
30	VVDEGPTGV	ДРЛ, КРК, меланома, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ
34	MLMPVHFL	РМЗ
37	GLLKKINSV	РМЗ, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, РЯ
38	NLVEKTPALV	ГМЛ
39	TLLSNLEEA	Рак сечового міхура, рак матки, НХЛ
40	FILDSAETTTL	ДРЛ, РМЗ, РЯ, рак стравоходу

Таблиця 4-2 (продовження)

SEQ ID No.	Послідовність	Додаткові види пухлин
41	FLLDGSEGV	ДРЛ, меланома, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
42	KLVDKSTEL	ДРЛ, РМЗ, меланома, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
43	RLDQRPQI	ДРЛ, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
44	VLLDKIKNLQV	ДРЛ, РЯ, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ
45	VADKIHSV	РМЗ, меланома, рак стравоходу, рак сечового міхура
46	TFAPVNVTTTEVK SV	Рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
47	KMDASLGNLFA	Рак стравоходу, рак сечового міхура
50	ALAAILTRL	Рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
51	ALMLQGVDL	РМЗ
53	SSFGGLGGGSV	РМЗ
54	VLLSEIEVA	Меланома, рак матки
55	YLDAMMNEA	РПМЗ, меланома, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
58	GLAAFKAFL	ДРЛ, РМЗ, меланома, рак стравоходу, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ, РЯ
60	YLEEDVYQL	Меланома, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ
64	FLVSNMLLAEA	Рак сечового міхура
65	YLYDSETKNA	ДРЛ, РМЗ, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
66	ALLSGLREA	РШ, РМЗ
67	KMFFLIDKV	РМЗ, меланома, РЯ, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ, РЯ

НДРЛ – недрібноклітинний рак легенів, ДРЛ – дрібноклітинний рак легенів, РН – рак нирки, РТПК – рак товстої і прямої кишки, РШ – рак шлунка, ГЦК – рак печінки, РПШЗ – рак підшлункової залози, РПМЗ – рак передміхурової залози, РМЗ – рак молочної залози, ККМ – карцинома з клітин Меркеля, РЯ – рак яєчника, НХЛ – неходжкінська лімфома, ГМЛ – гострий мієлоїдний лейкоз, ХЛЛ – хронічний лімфоцитарний лейкоз.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом, вибраного з групи, що складається з SEQ ID No. 3, 4, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 21, 23, 24, 30, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 50, 53, 58, 60, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85 і 86 для – у одному переважному втіленні комбінованого – лікування раку легенів.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 3, 4, 5, 15, 30, 45, 50, 58, 60, 65, 66, 68, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 і 86 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку нирки.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 3, 5, 15, 30, 36, 39, 47, 55, 67, 73, 74, 79, 81, 82, 86 і 87 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку головного мозку.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84 і 86 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку товстої кишки.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70,

71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84 і 86 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку прямої кишки.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84 і 86 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку стравоходу.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 4, 5, 15, 44, 66, 72, 78 і 86 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування меланоми.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 5, 15, 24, 30, 41, 55, 65, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 83 і 84 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку яєчника.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 9, 10, 11, 12, 41, 43, 60, 71, 72, 73, 78, 83 і 84 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку молочної залози.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 5, 30, 44, 55, 58, 65, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 76, 79, 81, 82, 85 і 86 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку печінки.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 10, 15, 24, 30, 34, 44, 45, 50, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 78, 81, 84 і 86 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку шлунка.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 23, 39, 64, 69, 73, 78, 81 і 82 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку передміхурової залози.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 16, 30, 66 і 74 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку лейкоцитів.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, які здатні зв'язуватись з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I класу або – у подовженій формі, такий як відмінний за довжиною варіант – МНС II класу.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згадані пептиди (кожний із них) складаються або по суті складаються з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид є модифікованим і (або) включає непептидні зв'язки.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид є частиною злитого білка, зокрема злитого з N-термінальними амінокислотами HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii) або злитого з послідовністю (або вбудованого у послідовність) антитіла, наприклад, антитіла, що є специфічним до дендритних клітин.

Цей винахід також стосується нуклеїнової кислоти, що кодує пептиди за цим винаходом. Цей винахід також стосується нуклеїнової кислоти за цим винаходом, яка являє собою ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їх комбінацію.

Цей винахід також стосується вектора експресії, що здатний експресувати і (або) експресує нуклеїнову кислоту за цим винаходом.

Цей винахід також стосується пептиду за цим винаходом, нуклеїнової кислоти за цим винаходом або вектора експресії за цим винаходом для застосування для лікування захворювань і в медицині, зокрема в лікуванні раку.

Цей винахід також стосується антитіл, які є специфічними по відношенню до пептидів за цим винаходом або комплексів згаданих пептидів за цим винаходом з МНС та способів їх отримання.

Цей винахід також стосується Т-клітинних рецепторів (ТКР), зокрема розчинних ТКР (рТКР), і клонованих ТКР, вбудованих у аутологічні або алогенні Т-клітини, та способів їх отримання, а також НК-клітин або інших клітин, що несуть згаданий ТКР або вступають у перехресну реакцію із згаданими ТКР.

Антитіла і (або) ТКР є додатковими втіленнями імунотерапевтичного застосування пептидів за винаходом що розглядається.

Цей винахід також стосується клітини-хазяїна за цим винаходом, що містить нуклеїнову кислоту за цим винаходом або вектор експресії, як зазначено вище. Цей винахід також стосується клітини-хазяїна за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина є дендритною клітиною, і переважно дендритною клітиною.

5 Цей винахід також стосується способу отримання пептиду за цим винаходом, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна за цим винаходом і виділення пептиду зі згаданого клітини-хазяїна або її культурального середовища.

Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, де антиген навантажують на молекули МНС I або II класу, що експресуються на поверхні відповідної антиген-презентуючої клітини або штучної антиген-презентуючої клітини шляхом контакту достатньої кількості антигену з антиген-презентуючою клітиною.

10 Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина містить вектор експресії, що здатний експресувати або експресує згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID No. 1 до SEQ ID No.: 67, переважно, що містить послідовність від SEQ ID No. 1 до SEQ ID No.34 або варіант амінокислотної послідовності.

15 Цей винахід також стосується активованих Т-клітин, отриманих згідно способу за цим винаходом, де згадана Т-клітина селективно розпізнає клітину, яка експресує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за цим винаходом.

20 Цей винахід також стосується способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберадно експресують поліпептид, що містить будь-яку амінокислотну послідовність за цим винаходом, причому спосіб включає введення в організм пацієнта ефективною кількістю Т-клітин за цим винаходом.

25 Цей винахід також стосується застосування будь-якого пептиду, що описаний тут, нуклеїнової кислоти за цим винаходом, вектора експресії за цим винаходом, клітини за цим винаходом або активованого Т-лімфоцита, Т-клітинного рецептора або антитіла або інших молекул, що зв'язують пептид або комплекс пептид-МНС, за цим винаходом як лікарського засобу або в процесі виробництва лікарського засобу. Переважно, якщо згаданий лікарський засіб виявляє протиракову активність.

30 Переважно, якщо згаданий лікарський засіб призначений для клітинної терапії, є вакциною, білком, виготовлений на основі розчинного ТКР або є антитілом.

Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де згадані ракові клітини є клітинами раку підшлункової залози, раку легенів, раку нирки, раку головного мозку, раку товстої або прямої кишки, раку стравоходу, раку молочної залози, раку яєчника, раку шлунка, раку печінки, раку передміхурової залози, меланоми і лейкозу, і переважно раку підшлункової залози.

35 Цей винахід також стосується біомаркерів на основі пептидів за цим винаходом, які у цьому документі іменуватимуться як "мішені", які можуть використовуватися в діагностиці раку, переважно раку підшлункової залози. Маркером може бути надмірна презентація самого(-их) пептиду(-ів) або надмірна експресія відповідного(-их) гена(-ів). Маркери також можуть використовуватися для передбачення вірогідності успіху лікування, переважно імунотерапії, і найбільш переважно імунотерапії, націленої на ту ж мішень, що ідентифікується біомаркером. Наприклад, антитіло або розчинний ТКР може використовуватися для барвлення зрізів пухлини для виявлення присутності досліджуваного пептиду у комплексі з МНС.

40 Необов'язково, антитіло містить додаткову функціональну ділянку, таку як імуностимулюючий домен або токсин.

Цей винахід також стосується цих нових мішеней у контексті лікування раку.

Як терапевтичне застосування проти інших типів раку, так і діагностичне застосування розкриті у наведеному нижче більш детальному описі продуктів експресії (поліпептидів), які є базовими для пептидів за цим винаходом.

50 Ген ACAT2 кодує ацетил-CoA ацетилтрансферазу 2, тіолазу, яка бере участь у метаболізмі ліпідів. ACAT2 експресується у високих кількостях у гепатоцелюлярній карциномі (Song et al., 2006). Експресія ACAT2 зв'язана з резистентністю ліній клітин раку підшлункової залози до променевої терапії (Soucek et al., 2014).

55 Ген ACTA1 кодує альфа-актин скелетних м'язів, члена сімейства білків актинів, які є високо консервативними білками, що відіграють певну роль у рухомості, структурі і цілісності клітин. Було показано, що ACTA1, класичний міоепітеліальний маркер, експресується на високому рівні у раково-асоційованих фібробластах при раку сечового міхура, пласкоклітинній карциномі порожнини рота, інвазивному раку молочної залози, раку шлунка, холангіокарциномі і метастатичній карциномі печінки і робить свій внесок у епітеліально-мезенхімальний перехід,

формування пухлинної строми і фіброз (Schulte et al., 2012; Franz et al., 2010; Kuroda et al., 2005; Nakayama et al., 2002; Terada et al., 1996).

Ген АСТА2 кодує альфа-актин гладеньких м'язів, члена сімейства білків актинів, які є високо консервативними білками, що відіграють певну роль у рухомості, структурі і цілісності клітин (RefSeq, 2002). Однонуклеотидний поліморфізм або варіації кількості копій АСТА2 були ідентифіковані при хронічному лімфоцитарному лейкозі, метастазах недрібноклітинного раку легені у головний мозок і в лініях клітин, отриманих із метастатичної меланоми (Berndt et al., 2013; Lee et al., 2012; Dutton-Regester et al., 2012). Очевидно, що функціонально високі рівні експресії АСТА2 пов'язані з підвищенням інвазивного потенціалу пухлинних клітин і утворенням метастазів (Kojima et al., 2014; Lee et al., 2013b; Tatenhorst et al., 2004).

Ген АСТВ кодує бета-актин, один з головних елементів скорочувального апарату і один із двох нем'язових цитоскелетних актинів (RefSeq, 2002). Було показано, що регуляція експресії АСТВ порушена при раку печінки, меланомі, раку нирки, колоректальному раку, раку шлунка, раку підшлункової залози, раку стравоходу, раку легенів, раку молочної залози, раку передміхурової залози, раку яєчника, лейкозі і лімфомі. Аномальна експресія і полімеризація АСТВ і утворені зміни у цитоскелеті, очевидно, пов'язані з інвазивністю і метастазуванням ракових пухлин (Guo et al., 2013).

Ген АСТА2 кодує капа-актин, члена сімейства білків актинів, які є високо консервативними білками, що відіграють певну роль у рухомості, структурі і цілісності клітин (RefSeq, 2002). Підвищена експресія АСТВ2 спостерігалася у клітинах гепатоцелюлярної карциноми і гепатоми, у яких вона змінювала властивості щодо росту клітин і була причетною до невтішного післяопераційного прогнозу (Chang et al., 2006; Chang et al., 2011).

Ген АСТС1 кодує альфа-актин 1 серцевого м'яза, який є головним елементом скорочувального апарату у кардіоміоцитах (RefSeq, 2002). Повідомлялося про змінену експресію АСТС1 у клітинах раку сечового міхура, недрібноклітинного раку легенів, лікованого паклітакселом, і хіміорезистентного раку яєчника (Zaravinos et al., 2011; Che et al., 2013; Pan et al., 2009). Більш того, АСТС1 може виявитися прийнятним діагностичним маркером раку передміхурової залози і рабдоміосаркоми (Huang et al., 2010; Clement et al., 2003).

Ген АСТГ1 кодує гамма-актин 1, виявлений у нем'язових клітинах цитоплазматичний актин, який становить основу клітинної рухливості (RefSeq, 2002). Було показано, що АСТГ1 надмірно експресується у тканинах дрібноклітинного раку легенів і остеосаркоми і його експресія знижена при епітеліальному раку яєчника (Li et al., 2010; Jeong et al., 2011; Chow et al., 2010). Повідомлялося, що зміни у рівні АСТГ1 сприяють інвазії і утворенню метастазів для різних видів ракових клітин. У клітинах раку товстої кишки і гепатоцелюлярної карциноми надмірна експресія АСТГ1 підвищує міграцію і інвазію, у той час як у клітинах меланоми і аденокарциноми слинної залози знижена експресія АСТГ1 пов'язана з цим фенотипом (Simiczyjew et al., 2014; Luo et al., 2014; Zhang et al., 2006; Gutgemann et al., 2001; Suzuki et al., 1998).

Ген АСТГ2 кодує гамма-актин 2, актин гладеньких м'язів, який становить основу клітинної рухливості (RefSeq, 2002). Обговорювалась можливість здійснення АСТГ2 функцій біомаркеру при діагностиці раку передміхурової залози. Було показано, що рівень його експресії високий у трансдиференційованих клітинах строми передміхурової залози (Fillmore et al., 2014; Untergasser et al., 2005). Стосовно хіміотерапії, рівень експресії АСТГ2 підвищується після обробки паклітакселом клітин раку гортані, ймовірно, що він задіяний у резистентності клітин раку молочної залози до дії цисплатину, і було показано, що існує позитивна кореляція його рівню з чутливістю колоректального раку з метастазами у печінку до режиму лікування FOLFOX4 (Xu et al., 2013; Watson et al., 2007; Lu et al., 2013b).

Ген АДАМ8 кодує АДАМ металопептидазний домен 8, члена сімейства АДАМ (домен дезінтегрину і металопроїнази), який бере участь у міжклітинній взаємодії і взаємодії клітини з матриксом (RefSeq, 2002). Надмірна експресія АДАМ8 при раку підшлункової залози асоціюється з підвищеною міграцією і інвазивністю клітин аденокарциноми протоків підшлункової залози (Schlomann et al., 2015). АДАМ8 бере участь у міграції і інвазії пухлинних клітин при раку легенів, нирковоклітинній карциномі і раку головного мозку (Mochizuki and Okada, 2007).

Ген АЕВР1 кодує білок 1, що зв'язує енхансер адіпоцитів — карбоксипептидазу А, яка може відігравати роль корепресору транскрипції, який є важливим для адіпогенезу і диференціації клітин гладеньких м'язів (RefSeq, 2002). АЕВР1 експресується на високому рівні при меланомі і робить свій внесок до набутої резистентності до інгібування гомологу мутантного вірусного онкогену мишачої саркоми v-Raf B1 (BRAF) (Hu et al., 2013). Рівень АЕВР1 є підвищеним у більшості первинних гліобластом (Reddy et al., 2008).

Ген ANNAK2 кодує каркасний білок ANNAK, нуклеопротейн 2 (Marg et al., 2010). ANNAK2 є важливим елементом неklasичного шляху секреції фактору росту фібробластів-1 (FGF1), елементу, що бере участь у рості і інвазії пухлини (Kirov et al., 2015).

Ген ANKH кодує гомолог білка прогресуючого анкілозу (мишачого) / регулятор транспорту неорганічного фосфату ANKH, політопний трансмембранний білок, який контролює рівні пірофосфату (RefSeq, 2002).

Ген ANO1 кодує аноктамін 1, кальцій-активованій хлоридний канал, асоційований із саркомою тонкої кишки і раком порожнини рота (RefSeq, 2002). ANO1 є ампліфікованим при пласкоклітинному раку стравоходу (ESCC), пухлинах строми шлунково-кишкового тракту (GIST), пласкоклітинній карциномі голови та шиї (HNSCC), ракових пухлинах підшлункової та молочної залози (Qu et al., 2014).

Ген APOB кодує аполіпопротеїн В, головний аполіпопротеїн хіломікронів і ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) (RefSeq, 2002). У альфа-фетопротейн-негативній ГЦК, пов'язаній з інфікуванням вірусом гепатиту В, було визначено, що APOB є одним із 14 диференційно експресованих білків, які можуть бути пов'язані з прогресуванням ГЦК (He et al., 2014). Для раку молочної залози на пізніх стадіях було визначено, що APOB є одним із 6 диференційно експресованих білків, які сприяють передбаченню сприйнятливості до неоад'ювантної хіміотерапії і безрецидивної виживаності пацієнтів (Hyung et al., 2011).

Ген ASPHD1 кодує білок 1, що містить домен аспартат-бета-гідроксилази. ASPHD1 локалізуються на хромосомі 16p11.2 (RefSeq, 2002).

Ген ATM кодує характерну для захворювання на атаксію- телеангіектазію мутантну форму члена сімейства PI3/PI4-кіназ, який є головним контролером сигнальних шляхів контрольних точок клітинного циклу, які необхідні для відповіді клітин на пошкодження ДНК і для стабільності геному (RefSeq, 2002). ATM є супресором пухлин, який часто є мутованим у широкому діапазоні ракових пухлин людини, включаючи рак легенів, молочної залози і кровотворної системи (Weber and Ryan, 2014).

Ген ATP5B кодує мітохондріальний комплекс АТФ-синтази (комплекс F1), що переносить H⁺, бета-поліпептид, бета-субодиницю каталітичного ядра мітохондріальної АТФ-синтази (RefSeq, 2002). Експресія гена ATP5B була значно вищою у тканинах колоректального раку у порівнянні зі здоровими тканинами (Geyik et al., 2014). Низький рівень експресії ATP5B у тканинах пухлин має тісний зв'язок з метастазуванням, інвазивністю і несприятливим прогнозом при раку жовчного міхура (Sun et al., 2015b).

Ген ATP5L кодує мітохондріальний комплекс АТФ-синтази (комплекс Fo), що переносить H⁺, субодиницю G компоненту мітохондріальної АТФ-синтази, що пронизує мембрану, який містить протонний канал (RefSeq, 2002).

Ген ATP5L2 кодує мітохондріальний комплекс АТФ-синтази (комплекс Fo), що переносить H⁺, субодиницю G2 компоненту мітохондріальної АТФ-синтази, що пронизує мембрану, який містить протонний канал (RefSeq, 2002).

Ген BACE2 кодує фермент 2 розщеплення бета-APP, інтегральний мембранний глікопротеїн і аспартатпротеази. BACE2 розщеплює попередника амілоїдного білка до бета-амілоїдного пептиду (RefSeq, 2002). BACE2 бере участь у функціонуванні бета-клітин підшлункової залози (Vassar et al., 2014).

Ген CCNB1 кодує циклін B1, регуляторний білок, що бере участь у мітозі (RefSeq, 2002). CCNB1 є добре вивченим пухлинним антигеном, і його надекспресія була описана для раку молочної залози, голови та шиї, передміхурової залози, колоректального раку, раку легенів і печінки (Egloff et al., 2006).

Ген CEACAM6 кодує пов'язану з раковомембрональним антигеном молекулу клітинної адгезії 6 (антиген, що неспецифічно перехресно реагує), члена сімейства CEACAM пухлинних маркерів (RefSeq, 2002). Експресія CEACAM6 підвищена у хворих на рак шлунка (Yasui et al., 2004). CEACAM6 є кандидатом у антигени пухлин молочної залози (Sood, 2010).

Ген CLTA кодує клатрин, легкий ланцюг А, структурний компонент облямованих ямок, що здійснює регуляторні функції (RefSeq, 2002). Ген CLTA демонструє альтернативний варіант сплайсингу у гліомі (Cheung et al., 2008).

Ген CLTB кодує клатрин, легкий ланцюг В, структурний компонент облямованих ямок, що здійснює регуляторні функції (RefSeq, 2002).

Ген CLU кодує секретований шаперон, який, можливо, бере участь у декількох головних біологічних подіях, таких як клітинна смерть, прогресування пухлини і нейродегенеративні захворювання (RefSeq, 2002). Ймовірно, що його роль у пухлиногенезі подвійна, оскільки у нормальних клітинах і під час ранніх стадій канцерогенезу CLU може інгібувати прогресування пухлин, у той час як у пухлинах на пізніх стадіях він може забезпечити значну перевагу що

стосується виживання, пригнічуючи численні терапевтичні стресори і прискорюючи розвиток метастазів. Було показано, що CLU відіграє вирішальну роль у патогенезі раку передміхурової залози, регулює агресивну поведінку клітин світлоклітинної нирково-клітинної карциноми людини шляхом модуляції сигнального шляху ERK1/2 і експресії MMP-9 і надає резистентність до лікарських засобів на пізніх стадіях раку легенів (Trogakos, 2013; Panico et al., 2009; Takeuchi et al., 2014; Wang et al., 2014b).

Ген COL12A1 кодує альфа-ланцюг колагену типу XII, члена сімейства колагенів FACIT (фібрил-асоційованих колагенів із розривами у потрійній спіралі), і таким чином є частиною позаклітинного матриксу (ECM) (RefSeq, 2002). COL12A1 надмірно експресується у резистентних до лікарських препаратів варіантів клітинних ліній раку яєчника (Januchowski et al., 2014). При колоректальному раку COL12A1 надмірно експресується у десмопластичній стромі у раково-асоційованих фібробластах і поблизу них, в також у ракових клітинах, що вистилають границі ділянки інвазії (Karagiannis et al., 2012).

Ген COL6A3 кодує ланцюг альфа-3 колагену VI типу, знайденого у більшості сполучних тканин колагену у вигляді філаментів-намистин, що відіграє важливу роль в організації компонентів матриксу (RefSeq, 2002). Повідомлялося, що експресія COL6A3 є підвищеною при раку підшлункової залози, раку товстої кишки, раку шлунка, мукоепідермоїдних карциномах і раку яєчника. Раково-асоційовані варіанти транскрипту, включаючи екзони 3, 4 і 6, були виявлені при раку товстої кишки, сечового міхура, передміхурової залози і підшлункової залози (Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008). При раку яєчника спостерігалася кореляція рівнів COL6A3 з високим ступенем злоякісності пухлини. Було показано, що при раку підшлункової залози COL6A3 являє собою прийнятний діагностичний сироватковий біомаркер (Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014).

Ген DCBLD2 кодує дискоїдин, білок 2, що містить домени CUB і LCCL, який також має назву нейроплін-подібний ендотеліальний та гладеньком'язовий трансмембранний корецепторний білок (RefSeq, 2002). Експресія DCBLD2 є підвищеною у гліобlastомах у ракових пухлинах голови та шиї (HNC), і він є необхідним для EGFR-стимульованого пухлиногенезу (Feng et al., 2014). Крім того, експресія DCBLD2 є підвищеною у сублінях клітин і зразках тканин раку легенів із високим метастатичним потенціалом (Koshikawa et al., 2002). Навпаки, експресія DCBLD2 пригнічується шляхом гіперметилування його промотору при раку шлунка (Kim et al., 2008).

Ген DUSP14, фосфатази 14 з подвійною специфічністю, здатний дефосфорилувати тирозинові, а також серин-треонінові залишки і відіграє певну роль у інактивації MAP-кіназного сигнального шляху (RefSeq, 2002). Однуклеотидні поліморфізми у гені DUSP14 мають зв'язок із зміною ризику розвитку меланоми (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013a).

Ген EEF1A1 кодує ізоформу альфа-субодиниці комплексу фактора елонгації 1, який забезпечує ферментативну доставку аміноацил-tPHK до рибосом (RefSeq, 2002). Було показано, що експресія EEF1A1 підвищена у багатьох видах ракових пухлин, включаючи колоректальний рак, рак яєчника, рак шлунка, рак передміхурової залози, гліобlastому і пласкоклітинну карциному. Він був описаний як потенційний сироватковий біомаркер раку передміхурової залози (Matassa et al., 2013; Vui-Kee et al., 2012; Lim et al., 2011; Kuramitsu et al., 2010; Kido et al., 2010; Scrideli et al., 2008; Qi et al., 2005; Rehman et al., 2012). З точки зору механізмів, EEF1A1 інгібує апоптоз шляхом взаємодії з p53 and p73, сприяє проліферації шляхом пригнічення транскрипції інгібітору клітинного циклу p21 і бере участь у регуляції епітеліально-мезенхімального переходу (Blanch et al., 2013; Choi et al., 2009; Hussey et al., 2011).

Ген EEF1A1P5 кодує псевдоген 5 еукаріотичного фактору 1 елонгації трансляції альфа 1 і локалізується на хромосомі 9q34.13 (RefSeq, 2002).

Ген FAMC3 є членом сімейства зі схожістю послідовностей 3 (FAM3) і кодує секретований білок із доменом GG. Зміна експресії цього білка спостерігалася у клітинах, отриманих з ракової пухлини підшлункової залози (RefSeq, 2002). У меланомі FAMC3 ідентифікували як кандидата у біомаркери аутофагії, важливого механізму виживання пухлинних клітин (Zou et al., 2002; Kraja et al., 2015). FAMC3 відіграє суттєву роль у епітеліально-мезенхімальному переході, який корелює з агресивністю, метастатичним прогресуванням пухлин і низькою виживаністю, особливо при гепатоцелюлярному раку, колоректальному раку, раку легенів і молочної залози (Csiszar et al., 2014; Gao et al., 2014c; Song et al., 2014; Chaudhury et al., 2010; Lahsnig et al., 2009).

Ген FAP кодує трансмембранну серин-протеазу, яка селективно експресується у реактивних фібробластах стромы пухлин епітеліального раку (раково-асоційованих фібробластах, або CAF), у грануляційній тканині ран, що загоюються, і злоякісних клітинах сарком кісток і м'яких

тканин (RefSeq, 2002). FAP відіграє важливу роль у рості ракових пухлин і метастазуванні шляхом його участі у процесах клітинної адгезії і міграції і ремоделювання позаклітинного матриксу (ECM) (Jacob et al., 2012). Надмірна експресія FAP корелює з несприятливим прогнозом, пізніми стадіями розвитку пухлини, метастатичному і інвазивному потенціалі різних видів раку відповідно до цього, раку товстої кишки, плоскоклітинної карциноми стравоходу, аденокарциноми підшлункової залози, гліобластоми, остеосаркоми, раку яєчника і раку молочної залози (Wikberg et al., 2013; Kashyap et al., 2009; Cohen et al., 2008; Mentlein et al., 2011; Yuan et al., 2013; Zhang et al., 2011; Ariga et al., 2001).

Ген FKBP10 кодує FK506-зв'язувальний білок 10, який належить до сімейства пептидил-проліл-цис/транс-ізомераз FKBP-типу. Продукт гена FKBP10 локалізується в ендоплазматичному ретикулумі і діє як молекулярний шаперон (RefSeq, 2002). FKBP10 був ідентифікований як новий ген, який бере участь у набутті лейкозними клітинами адриаміцин-резистентного фенотипу і його підтримці (Sun et al., 2014). FKBP10 асоціювався з колоректальним раком через його підвищену експресію (Olesen et al., 2005). Навпаки, недостатня експресія FKBP10 була характерною для епітеліальних карцином яєчника (Quinn et al., 2013).

Ген FLNA кодує філамін А, білок, що зв'язує актин, який зшиває волокна актину і зв'язує волокна актину з мембранними глікопротеїнами. Кодований білок бере участь у ремоделюванні цитоскелета, що призводить до змін у формі клітин і їх міграції, а також взаємодіє з інтегринами, комплексами трансмембранних рецепторів і вторинними переносниками інформації (RefSeq, 2002). Залежно від субклітинної локалізації, філамін А відіграє подвійну роль у ракових пухлинах: у цитоплазмі філамін А діє у різних сигнальних шляхах факторів росту клітин, на додаток до участі у міграції клітин і каскадах адгезії. Таким чином, надмірна експресія сприяє пухлинному росту. На відміну від повнорозмірного філаміну А, С-кінцевий фрагмент, який вивільняється після протеолізу, локалізується у ядрі, де він взаємодіє з факторами транскрипції і таким чином пригнічує ріст і метастазування пухлини (Savoy and Ghosh, 2013).

Ген GGA1 кодує члена сімейства білків (GGA), який локалізований в апараті Гольджі, містить домен "вуха" гамма-адаптинів і зв'язує ARF. Члени цього сімейства є повсюдними білками-коатомерами, які регулюють транспорт білків між транс-Гольджі-мережею і ліпосоною (RefSeq, 2002).

Ген HBB кодує бета-ланцюг гемоглобіну людини, металопротеїну еритроцитів, що містить залізо і транспортує кисень (RefSeq, 2002). Здатність раку молочної залози утворювати кісткові метастази і метастази у внутрішні органи являє собою чітке свідчення несприятливого клінічного прогнозу у порівнянні з випадками раку молочної залози з метастазами, обмеженими кістками. Підвищена експресія HBB у кісткових метастазах корелювала з їх здатністю швидко розповсюджуватися на інші органи (Capulli et al., 2012). Було показано, що HBB надмірно експресується у тканинах карциноми шийки матки. Ектопічна експресія HBB у клітинах раку шийки матки пригнічувала окислювальний стрес і покращувала життєздатність клітин (Li et al., 2013).

Ген HBB кодує дельта-ланцюг гемоглобіну людини, металопротеїну еритроцитів, що містить залізо і транспортує кисень. Два альфа-ланцюги разом із двома дельта-ланцюгами утворюють гемоглобін A2, який разом із гемоглобіном F становить 3 % від усього зрілого гемоглобіну (RefSeq, 2002).

Ген HKDC1 кодує білок 1, що містить гексокіназний домен і виявляє гексокіназну активність *in vitro* (Guo et al., 2015). Використовуючи новий метод ідентифікації потенційних терапевтичних мішеней із неоднорідних даних, HKDC1, серед інших добре відомих терапевтичних мішеней, був виявлений як нова потенційна терапевтична мішень для лікування раку легенів (Li and Huang, 2014).

Ген HSPD1 кодує мітохондріальний білок 1 теплового шоку 60 кДа, члена сімейства шаперонінів, який є суттєвим для фолдингу і збірки щойно імпортованих білків у мітохондріях і може виконувати функції сигнальної молекули в природній імунній системі (RefSeq, 2002). Хоча HSPD1 вважається внутрішньомітохондріальним білком, його виявили у цитозолі, клітинній мембрані, везикулах, на клітинній поверхні, у позаклітинному просторі і у крові. Оскільки рівні HSPD1 у цитозолі поступово підвищуються або знижуються під час канцерогенезу у різних органах, HSPD1 можливо використовувати як біомаркер для діагностики і прогнозу розвитку передпухлинних змін і пухлинних уражень. Більш того, деякі нещодавно ідентифіковані функції HSPD1 асоціюються з канцерогенезом, конкретно з виживанням і проліферацією пухлинних клітин, і інтенсивно обговорювалась можливість його застосування як мішені протипухлинної терапії (Pace et al., 2013; Nakamura and Minegishi, 2013; Cappello et al., 2013; Cappello et al., 2011; Cappello et al., 2008).

Ген HYOU1 кодує білок 1, що надмірно експресується за умов гіпоксії, краще відомий під назвою регульованого глюкозою білка 170 кДа (GRP170), який належить до сімейства білків теплового шоку 70. Експресія HYOU1 індукується за стрес-залежним механізмом за умов гіпоксії і приводить до накопичення білка в ендоплазматичному ретикулумі (ЕР). Вважають, що білок, який кодується HYOU1, відіграє важливу роль у фолдингу і секреції білків у ЕР (RefSeq, 2002). Було показано, що активність внутрішньоклітинного білка HYOU1 надає користь для виживання ракових клітин під час прогресування пухлин або розвитку метастазів. Позаклітинний білок HYOU1 відіграє суттєву роль у розвитку протипухлинної імунної відповіді шляхом прискорення доставки пухлинних антигенів для їх крос-презентації (Fu and Lee, 2006; Wang et al., 2014a). Білок HYOU1 був впроваджений у імунотерапію і показав позитивний імуномодуючий ефект (Yu et al., 2013; Chen et al., 2013a; Yuan et al., 2012; Wang and Subjeck, 2013). У клітинах раку передміхурової залози пригнічення HYOU1 показало протипухлинний ефект (Miyagi et al., 2001).

Ген IFT88 кодує члена сімейства тетратрікопептидних повторів (TPR) (RefSeq, 2002). У процесі мітозу IFT88 є частиною динеїн-1-керованого комплексу, який транспортує кластери периферійних мікротрубочок до полюсів веретена для забезпечення належної орієнтації веретена. Виснаження IFT88 призводить до мітотичних дефектів у культурах клітин людини (Delaval et al., 2011). Втрата генної експресії IFT88 (також відомого під назвою Tg737) приводить до проліферації стовбурових клітин печінки (овальних клітин), і він є, таким чином, геном-супресором пухлин (неоплазій) печінки (Isfort et al., 1997). У 2012 році було показано, що мутація є відповідальною за нову форму порушення функції війок і аносмії у людей, які вдалося вилікувати у мишей шляхом генної терапії із застосуванням аденовірусів (McIntyre et al., 2012).

Ген IGF2BP3 кодує зв'язувальний білок 3 iPHK гена, що кодує інсуліноподібний фактор росту II, онкофетальний білок, який пригнічує трансляцію інсуліноподібного фактора росту II (RefSeq, 2002). У декількох дослідженнях було показано, що IGF2BP3 відіграє роль у різних важливих аспектах клітинних функцій, таких як поляризація, міграція, морфологія, метаболізм, проліферація і диференціація клітин. Дослідження *in vitro* показали, що IGF2BP3 сприяє проліферації, адгезії і інвазії пухлинних клітин. Більш того, було показано, що IGF2BP3 асоціюється з агресивними формами раку і з поширеною формою раку (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014). Надмірну експресію IGF2BP3 було описано у багатьох видах раку. Вона корелює з несприятливим прогнозом, пізніми стадіями розвитку пухлини і наявністю метастазів, наприклад, при нейробластомі, колоректальній карциномі, внутрішньопечінковій холангіокарциномі, гепатоцелюлярній карциномі, раку передміхурової залози і нирково-клітинній карциномі (Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013b; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013b; Yuan et al., 2009).

Ген ITGB4 кодує білок сімейства інтегринів. Інтегрини є гетеродимерами, які складаються з нековалентно зв'язаних альфа- і бета-субодиниць і є трансмембранними глікопротеїновими рецепторами. Вони опосередковують адгезію клітин до матриксу та міжклітинну адгезію і передають сигнали, які регулюють генну експресію і ріст клітин (RefSeq, 2002). ITGB4 (також відомий під назвою CD104) виявляє тенденцію до асоціації з субодиницею альфа-6 і, ймовірно, відіграє головну роль у біологічних властивостях декількох інвазивних карцином, таких як пласкоклітинна карцинома стравоходу, карциноми сечового міхура і яєчника (Kwon et al., 2013; Pereira et al., 2014; Chen et al., 2014b). Однонуклеотидний поліморфізм у гені ITGB4, очевидно, впливає на агресивність пухлин і виживаність і може мати прогностичне значення для пацієнтів із раком молочної залози (Brendle et al., 2008).

Ген KCNK6 кодує одного з членів надсімейства білків калієвих каналів, які містять Р-домени, що утворюють подвійні пори. Цей каналний білок, який вважається відкритим випрямлячем, широко експресується. Він стимулюється арахідоновою кислотою, а інгібується внутрішнім підкисленням і леткими анестетиками (RefSeq, 2002). KCNK6 (який також має назву K2P6.1) разом із K2P1.1, K2P3.1, K2P5.1, K2P6.1, K2P7.1 і K2P10.1, показав дуже низький рівень експресії у багатьох видах ракових пухлин, досліджених за допомогою онлайнової бази мікрочіпових онкологічних даних, Oncomine (www.oncomine.org) (Williams et al., 2013).

Цей ген KCNN3 належить до сімейства калієвих каналів KCNN. Він кодує інтегральний мембранний білок, який формує потенціал-незалежні канали, що активуються кальцієм, які вважають такими, що регулюють нейрональну збудливість, беручи участь у повільному компоненті синаптичної слідової гіперполяризації (RefSeq, 2002). Було показано, що експресія KCNN3 (який також має назву TASK-1) знижується під впливом 17-бета-естрадіолу у клітинах мишачої нейробластоми N2A, і він сприяв проліферації клітин (Нао et al., 2014). Експресія KCNN3 підвищувалась під дією фізіологічних концентрацій 1,25-дигідрокси-вітаміну D (3) і його

концентрацій, вищих за фізіологічні, на органотропну культуру клітин раку молочної залози (Milani et al., 2013). KCNN3 (який також має назву K2P3.1), разом із K2P1.1 і K2P12.1, мав підвищені рівні експресії у ряді ракових пухлин, досліджених за допомогою онлайнової бази мікрочіпових онкологічних даних, Oncomine (www.oncomine.org) (Williams et al., 2013).

5 Ген KDM1A (який також має назву LSD1) кодує ядерний білок, що містить домен SWIRM, FAD-зв'язувальний мотив і домен амінооксидази. Цей білок є компонентом декількох комплексів гістон-деацетилази, хоча він призводить до сайленсингу генів шляхом здійснення функції гістон-деметилази (RefSeq, 2002). Надмірна експресія KDM1A сприяє проліферації, міграції і інвазії пухлинних клітин і асоціюється з несприятливим прогнозом у хворих на НДРЛ і ГЦК (Lv et al., 2012; Zhao et al., 2013). Підвищена експресія KDM1A корелює з рецидивами раку передміхурової залози і з підвищеною експресією VEGF-A (Kashyap et al., 2013). Інгібування KDM1A комбінацією трихостатину А (TSA) і 5-аза-2'-деоксцитидину (децитабіну) пригнічує онкогенність асцитних клітин раку яєчника лінії SKOV3 (Meng et al., 2013).

15 Ген KIF26B кодує члена надсімейства білків кінезинів (KIF), який є важливим для розвитку нирок. Експресія KIF26B обмежена метанефричною мезенхімою, а його транскрипція регулюється транскрипційним регулятором Sall1, що містить домен "zinc finger" (Terabayashi et al., 2012). Високий рівень експресії KIF26B при раку молочної залози асоціюється з несприятливим прогнозом (Wang et al., 2013b). Підвищена експресія KIF26B значуще корелює з розміром пухлини, судячи з даних аналізу тканин пухлин КРК і відповідної прилеглої нормальної слизової оболонки. KIF26B відіграє важливу роль у колоректальному канцерогенезі і виконує функції нового прогностичного індикатору і потенційної терапевтичної мішені для КРК (Wang et al., 2015).

25 Ген KRT19 кодує члена сімейства кератинів. Кератини є білками проміжних філаментів, відповідальними за структурну цілісність клітин епітелію. Їх поділяють на цитокератини і кератини волосся. KRT19 специфічно експресується у перидермі, тимчасовому поверхневому шарі, який обгортає епідерміс, що розвивається (RefSeq, 2002). Експресія KRT19 у пухлинних клітинах є прогностичним маркером для декількох видів пухлин, таких як ракові пухлини молочної залози, легенів, яєчника і гепатоцелюлярного раку (Skondra et al., 2014; Gao et al., 2014b; Liu et al., 2013b; Lee et al., 2013a). Було показано, що KRT19 є незалежним прогностичним фактором розвитку нейроендокринних пухлин підшлункової залози, особливо інсулін-негативних пухлин. KRT19-позитивні пухлини асоціюються з несприятливим прогнозом незалежно від встановлених показників патології, таких як розмір, мітоз, лімфоваскулярна інвазія і некроз (Jain et al., 2010).

35 Ген KRT7 кодує члена сімейства кератинів. Цитокератини типу II складаються з основних або нейтральних білків, які організуються у пари гетеротипових кератинових ланцюгів, які сумісно експресуються під час диференціації простих і багатошарових епітеліальних тканин. Цей цитокератин типу II специфічно експресується у простому епітелії, який вистилає порожнини внутрішніх органів, і у протоках залоз і кровоносних судинах (RefSeq, 2002). KRT7 використовується у імуногістохімічних методах для розрізнення декількох фенотипів і як біомаркер для прогнозу перебігу певних ракових захворювань, таких як нирковоклітинна карцинома, карцинома яєчника, епітеліальні пухлини шкіри тощо (Kuroda et al., 2013; McCluggage and Young, 2005; Alhumaidi, 2012).

45 Ген LAMC2 належить до сімейства ламінінів, сімейства глікопротеїнів позаклітинного матриксу. Ламініни є головними неколагенними компонентами базальних мембран. Вони причетні до широкого спектру біологічних процесів, включаючи адгезію клітин, їх диференціацію, міграцію, передачу сигналів, відростання нейритів і розвиток метастазів. LAMC2 кодує білок, який експресується у декількох тканинах плоду і специфічно локалізований у епітеліальних клітинах шкіри, легенів і нирок (RefSeq, 2002). LAMC2 експресується на високому рівні в анапластичній карциномі щитоподібної залози і асоціюється з прогресуванням, міграцією і інвазією пухлини шляхом модуляції сигнального шляху EGFR (Garg et al., 2014). Експресія LAMC2 служила передбаченням несприятливого прогнозу у пацієнтів з стадією II колоректального раку (Kevans et al., 2011). Було виявлено, що експресія LAMC2 разом з трьома іншими біомаркерами значуще асоціюється з присутністю метастазів у лімфовузлах пацієнтів з пласкоклітинною карциномою порожнини рота (Zanaruddin et al., 2013).

55 Ген LUM кодує члена сімейства малих протеогліканів, багатих лейцином (SLRP), яке включає декорин, біглікан, фібромодулін, кератокан, епіфікан і остеогліцин. Люмікан є головним протеогліканом рогівки на основі кератан-сульфату, але також розподілений по всьому організму в колагеновому інтерстиціальному матриксі. Люмікан здатний регулювати організацію і периферійний ріст колагенових фібрил, прозорість рогівки, міграцію епітеліальних клітин і відновлення тканин (RefSeq, 2002). Експресія білка LUM підвищена у тканинах більшості

пухлин, таких як рак молочної залози, колоректальний рак і рак підшлункової залози у порівнянні з нормальною тканиною і асоціюється з високим ступенем злоякісності і несприятливим прогнозом. Однак позаклітинний люмікан інгібує ріст клітин раку підшлункової залози і пов'язаний з довшою виживаністю після хірургічного лікування (Leygue et al., 1998; Seya et al., 2006; Ishiwata et al., 2007; Li et al., 2014). LUM та інші гени, пов'язані з цілісністю позаклітинного матриксу (DCN і DPT), диференційно експресуються і можуть служити біомаркерами метастатичної і рецидивної пухлини гігантських клітин кісток (Lieveld et al., 2014). Експресія LUM знижена у варіантів ліній клітин раку яєчника A2780, резистентних до цисплатину, доксорубіцину, топотекану і паклітакселу (Januchowski et al., 2014).

Ген MAP4 кодує головний білок, що є асоційованим з мікротрубочками ненейронального походження, який сприяє збірці мікротрубочок і протидіє їх дестабілізації проти катастрофічного руйнування в інтерфазі. Фосфорилування цього білка впливає на властивості мікротрубочок і проходження клітин через клітинний цикл (RefSeq, 2002). Було показано, що існує позитивна кореляція між високими рівнями MAP4 і ступенем злоякісності раку сечового міхура, у той час як фосфорилування білка протеїнкіназою A знижує міграцію і інвазію клітин раку сечового міхура (Ou et al., 2014). Результати дослідження на пацієнтах, хворих на недрібноклітинний рак легенів свідчать про високе співвідношення MAP4 до iPHK статміну у зразках пухлин у порівнянні з нормальними зразками, що вказує на те, що це співвідношення може служити біомаркером недрібноклітинного раку легенів (Cucchiarelli et al., 2008). Рівні MAP4, якому властива негативна регуляція з боку супресору пухлини p53, впливають на ефективність дії речовин, мішенню яких є мікротрубочки. Високі рівні підвищують ефект лікарських препаратів, які стабілізують мікротрубочки (таксанів) і зменшують ефект препаратів, які дестабілізують мікротрубочки (алкалоїдів барвінка), у той час як низькі рівні MAP4 справляють протилежну дію (Hait and Yang, 2006; Galmarini et al., 2003; Zhang et al., 1999).

Ген MMP7 кодує фермент, який розкладає протеоглікани, фібронектин, еластин і казеїн і відрізняється від більшості членів сімейства MMP у тому, що у ньому відсутній консервативний С-термінальний білковий фрагмент. Білки сімейства матричної металопротеїнази (MMP) беруть участь у руйнуванні позаклітинного матриксу в нормальних фізіологічних процесах, таких як розвиток ембріону, репродукція і ремоделювання тканин, а також у процесах, пов'язаних із захворюваннями, таких як артрит і метастазування (RefSeq, 2002). MMP7 часто надмірно експресується у тканинах раку людини, включаючи колоректальний рак, метастатичну карциному легенів і рак шлунка, і асоціюється з прогресуванням раку і метастазуванням (Li et al., 2006; Sun et al., 2015a; Han et al., 2015; Long et al., 2014). Було показано, що MMP7 відіграє важливу роль у сприянні розвитку пухлин, таких процесах як деградація білків позаклітинного матриксу, активація проліферації пухлинних клітин шляхом підвищення біологічної доступності інсуліноподібного фактору росту і гепарин-зв'язувального епідермального фактора росту, і індукція апоптозу у клітинах, прилеглих до пухлини, шляхом відчеплення зв'язаного з мембраною Fas-ліганду (Li et al., 2006).

Ген MROH6, також відомий під назвою C8orf73, локалізуються на хромосомі 8q24.3 (RefSeq, 2002).

Ген MX1 кодує білок, що метаболізує гуанозинтрифосфат (ГТФ). Цей білок індукується інтерферонами типу I і типу II і бере участь у відповіді клітин на дію вірусів (RefSeq, 2002). Роль MX1 в онкології поки що повністю не з'ясована. З одного боку, існує зворотна кореляція рівню експресії MX1 з раком передміхурової залози, спостерігається зниження метастазування і підвищення чутливості до доклетакселу. Більш того, був виявлений епігенетичний сайленсинг MX1 шляхом гіперметилування у пласкоклітинній карциномі голови та шиї. Експресія MX1 знижує рухливість клітин і інвазію ліній клітин раку передміхурової залози і меланоми, все це сприяє пригнічувальній дії MX1 на пухлину (Brown et al., 2015; Calmon et al., 2009; Mushinski et al., 2009). З іншого боку, однонуклеотидний поліморфізм у гені MX1 має зв'язок із раком передміхурової залози, а високий рівень експресії MX1 пов'язаний з метастазами у лімфатичні вузли при колоректальному раку, що свідчить про онкогенні властивості MX1 (Croner et al., 2014; Glymph et al., 2013).

Ген MXRA5 кодує один із пов'язаних з ремоделюванням матриксу білків, який містить 7 лейцин-збагачених повторів і 12 імуноглобуліноподібних доменів C2-типу, споріднених із перлеканом (RefSeq, 2002). У проведеному в Китаї дослідженні MXRA5 виявився другим за частотою мутованим геном у недрібноклітинному раку легенів (Xiong et al., 2012). Було показано, що MXRA5 є надмірно експресованим при раку товстої кишки і його можливо використовувати як біомаркер для ранньої діагностики і метастазів у сальник (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

Ген MYH9 кодує важкий ланцюг традиційного нем'язового міозину IIA, який містить IQ-домен і домен, подібний "голівці" міозину, що здійснює декілька важливих функцій, включаючи цитогенез, рухливість клітин і підтримку форми клітин (RefSeq, 2002). Було показано, що високий півень експресії MYH9 асоціюється з несприятливим прогнозом пласкоклітинної карциноми стравоходу і, у комбінації з анексином II і білком "kindling-2", може служити при цьому захворюванні прогностичним біомаркером загальної виживаності і виживаності без ознак захворювання (Xia et al., 2012; Cao et al., 2014). Мутації у гені MYH9 були виявлені у зразках раку молочної залози людини. Він диференційно експресується у карциномі товстої кишки (Ellis et al., 2012; Mu et al., 2013). Дослідження *in vitro* і дослідження ксенотрансплантатів вказують на те, що MYH9 сприяє росту і інвазії пухлинних клітин різних ліній пухлинних клітин, включаючи клітини раку молочної залози і недрібноклітинного раку легенів (Robinson et al., 2013; Lin et al., 2013a; Lund et al., 2012; Derycke et al., 2011; Medjkane et al., 2009).

Ген MYL12A кодує регуляторний легкий ланцюг несаркомерного міозину, який регулює скорочення гладеньком'язових і нем'язових клітин (Amatschek et al., 2004; RefSeq, 2002). Повідомлялося, що фосфорилування MYL12A сприяє рухливості пухлинних клітин і інвазії *in vitro* і на моделі тварин (Manning, Jr. et al., 2000; Kaneko et al., 2002; Khuon et al., 2010). Більш того, ймовірно, що MYL12A регулює репарацію пошкоджень ДНК і р53-залежний апоптоз шляхом секвестрування регулятора транскрипції, фактора транскрипції, що протидіє апоптозу (Hopker et al., 2012a; Hopker et al., 2012b).

Ген MYL12B кодує регуляторний легкий ланцюг нем'язового міозину II (MYH9). Фосфорилування MYL12B приводить до вищої активності Mg-АТФази і збірці філаментів міозину II (RefSeq, 2002). Було показано, що експресія білка підвищена при раку яєчника 3 ступеню злоякісності і що фармакологічне блокування фосфорилування або активації MYL12B зменшує міграцію пухлинних клітин і інвазію *in vitro* і утворення метастазів раку молочної залози на моделі тварин. Ці дані свідчать про про-метастатичну роль MYL12B (Lim et al., 2011; Menhofer et al., 2014; Zhang et al., 2013; Patel et al., 2012).

Ген PARD3B кодує білок, який локалізується у щільних контактах між клітинами епітелію і бере участь у встановленні полярності клітин (Izaki et al., 2005). Було показано, що одонуклеотидний поліморфізм у гені PARD3B має значущий зв'язок із тяжкою гепатотоксичністю, пов'язаною з лікарськими препаратами, у дітей з гострим лімфобластним лейкозом або лімфобластною лімфомою (Horinouchi et al., 2010).

Ген PDIA6 (який також має назву ERp5) кодує білок дисульфідізомеразу, яка є резидентним білком ендоплазматичного ретикулуму (ER) і каталізує утворення, розпад і ізомеризацію дисульфідних зв'язків у білках. Вважають, що вона відіграє роль у фолдингу білків, з'єднаних дисульфідним зв'язком (RefSeq, 2002). Імунне забарвлення мікроразрізів тканини передміхурової залози для виявлення PDIA6 показало значуще вищу імунореактивність передракових уражень у порівнянні з незлоякісним епітелієм ($P < 0,0001$, U-критерій Манна-Уїтні) і у зразках раку з високим балом за шкалою Глісона (4–5) у порівнянні зі зразками з низьким показником злоякісності (2–3) ($P < 0,05$) (Glen et al., 2010). Високий рівень експресії ERp5/ADAM10 призводить до злущування MICA і до порушення впізнавання NKG2D-лігандів у мікрооточенні лімфатичного вузла у ходжкінських лімфомах. Це веде до зниження рівня поверхневої експресії NKG2D на CD8 Т-клітинах і до неефективної протипухлинної відповіді (Zocchi et al., 2012). Білки дисульфідізомераз PDIA4 і PDIA6 опосередковують резистентність до дії цисплатину, який викликає загибель клітин аденокарциноми легенів (Horibe et al., 2014).

Ген PIK3IP1 кодує білок 1, який взаємодіє з фосфоінозитид-3-кіназою, інгібітором PI3K (RefSeq, 2002). Низький рівень експресії PIK3IP1 веде до підвищеного росту клітин у пухлинах Т-клітинної лімфобластної лімфоми людини (Wong et al., 2014). Рівень експресії PIK3IP1 є зниженим у гепатоцелюлярній карциномі (ГЦК), і PIK3IP1 пригнічує розвиток ГЦК (He et al., 2008).

Ген PLEC кодує члена сімейства плакінів, плектин, білок, який бере участь у утворенні перехресних зв'язків і організації цитоскелета і комплексів адгезії (Bouameur et al., 2014). PLEC надмірно експресується у колоректальній аденокарциномі, пласкоклітинній карциномі голови та шиї і пухлинах раку підшлункової залози (Lee et al., 2004; Katada et al., 2012; Bausch et al., 2011).

Ген POTEЕ кодує сімейство POTE поліпептидів, що містять анкіриновий домен, члена Е, одного з 13 паралогів, що належать до сімейства генів POTE. Вважається, що гени POTE являють собою нове сімейство раково-тестикулярних антигенів. Біологічна функція сімейства генів POTE поки що повністю не з'ясована, але деякі результати свідчать про їх проапоптотичну дію (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEЕ переважно експресується у ракових пухлинах передміхурової залози, молочної залози, товстої кишки, легенів і яєчника (Bera et al., 2006). В

одному із досліджень було описано, що POTE має тісний зв'язок з раком молочної залози. Ці результати були отримані з використанням комбінованого транскриптомного і протеомного аналізу (Cine et al., 2014).

Ген POTEF кодує POTE сімейство POTE поліпептидів, що містять анкіриновий домен, члена J, одного з 13 паралогів, що належать до сімейства генів POTE. Вважається, що гени POTE являють собою нове сімейство раково-тестикулярних антигенів. Біологічна функція сімейства генів POTE поки що повністю не з'ясована, але деякі результати свідчать про їх проапоптотичну дію (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). Було показано, що POTEF викликає апоптоз клітин Hela через мітохондріальний шлях (Liu et al., 2009). POTEF переважно експресується у ракових пухлинах передміхурової залози, молочної залози, товстої кишки, легенів і яєчника (Bera et al., 2006).

Ген POTEI локалізується на хромосомі 2q21.1 і кодує сімейство POTE поліпептидів, що містять анкіриновий домен, члена I, одного з 13 паралогів, що належать до сімейства генів POTE. Вважається, що гени POTE являють собою нове сімейство раково-тестикулярних антигенів. Біологічна функція сімейства генів POTE поки що повністю не з'ясована, але деякі результати свідчать про їх проапоптотичну дію (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEI переважно експресується у ракових пухлинах передміхурової залози, молочної залози, товстої кишки, легенів і яєчника (Bera et al., 2006).

Ген POTEJ кодує POTE сімейство POTE поліпептидів, що містять анкіриновий домен, члена J, одного з 13 паралогів, що належать до сімейства генів POTE. Вважається, що гени POTE являють собою нове сімейство раково-тестикулярних антигенів. Біологічна функція сімейства генів POTE поки що повністю не з'ясована, але деякі результати свідчать про їх проапоптотичну дію (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEJ переважно експресується у ракових пухлинах передміхурової залози, молочної залози, товстої кишки, легенів і яєчника (Bera et al., 2006).

Ген POTEKP кодує POTE сімейство POTE поліпептидів, що містять анкіриновий домен, члена K, псевдогена, який локалізується на хромосомі 2q21.1 (RefSeq, 2002).

Ген POTE M кодує POTE сімейство POTE поліпептидів, що містять анкіриновий домен, члена M, одного з 13 паралогів, що належать до сімейства генів POTE. Вважається, що гени POTE являють собою нове сімейство раково-тестикулярних антигенів. Біологічна функція сімейства генів POTE поки що повністю не з'ясована, але деякі результати свідчать про їх проапоптотичну дію (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTE M був ідентифікований як специфічний транскрипт для нормальних і злоякісних тканин передміхурової залози (Stolk et al., 2004).

Ген PTRF кодує полімеразу I і рілізінг-фактор транскрипції, регулятор транскрипції рРНК, який сприяє дисоціації комплексів транскрипції і повторно ініціює полімеразу I на вивільнення рРНК-транскриптів, що ростуть (RefSeq, 2002). Експресія PTRF знижена у лініях клітин раку молочної залози і тканинах пухлин молочної залози (Bai et al., 2012). PTRF є маркером недрібноклітинного раку легенів (Gamez-Pozo et al., 2012). Експресія PTRF знижена у пухлинах раку передміхурової залози, і відсутність PTRF у клітинах раку передміхурової залози відіграє значну роль у прогресуванні пухлин і розвитку метастазів шляхом підвищення ангіогенного потенціалу ракових клітин (Nassar et al., 2013).

Ген PUS7L кодує білок, подібний до гомологу псевдоуриділат-синтази 7 (дріжджі), білок з можливою псевдоуридин-синтазною активністю. Ген PUS7L локалізується на хромосомі 12q12 (RefSeq, 2002).

Ген RAN кодує RAN, члена сімейства RAS-онкогенів, невеликий ГТФ-зв'язувальний білок, що бере участь у транслокації РНК і білків через комплекс ядерних пор, у контролі синтезу ДНК і проходженні клітин через клітинний цикл, у формуванні і організації мережі мікротрубочок і у активації андрогенного рецептора (RefSeq, 2002). RAN є ключовим білком у метастатичному прогресуванні раку. RAN надмірно експресується у цілому ряді пухлин, таких як молочної залози та нирки (Matchett et al., 2014).

Ген RANP1 кодує RAN, псевдоген 1, члена сімейства RAS-онкогенів, псевдоген, який локалізується на хромосомі 6p21.33 (RefSeq, 2002).

Ген RASA4 кодує активатор 4 RAS-білка (p21), Ca (2+)-залежний ГТФазу-активуючий білок, який деактивує Ras-MAPK-шлях у відповідь на дію Ca (2+) (RefSeq, 2002). RASA4 є значуще ампліфікованим у первинній ефузійній лімфомі (Roy et al., 2011). RASA4 диференційно експресується у аденокарциномі ендометрію у порівнянні з нормальним ендометрієм (Jeda et al., 2014).

Ген RASA4B кодує активатор 4B RAS-білка (p21), Ca (2+)-залежний ГТФазу-активуючий білок, який, можливо, бере участь у регуляції Ras-MAPK-шляху (RefSeq, 2002)

Ген RCN1 кодує ретикулокальбін 1, білок із кальцій-зв'язувальним доменом "EF-hand", кальцій-зв'язувальний білок, локалізований у порожнині ендоплазматичного ретикулу. RCN1

локалізується у плазматичній мембрані клітин ліній раку ендотелію і передміхурової залози людини (RefSeq, 2002). Експресія RCN1 підвищена у хворих на рак молочної залози (Amatschek et al., 2004).

5 Ген RGS4 кодує регулятор 4 сигнального шляху G-білка, ГТФазу-активуючий білок (GAP) для субодиниць G-альфа гетеродимерних G-білків (RefSeq, 2002). Був виявлений статистично значущий низький рівень експресії RGS4 у метастазах в печінку і на фронті інвазії пухлини у порівнянні з первинною пухлиною підшлункової залози (Niedergethmann et al., 2007). RGS4 дуже часто є надмірно експресованим у карциномах щитоподібної залози, хоча він не експресується у нормальних тканинах людини (Nikolova et al., 2008). Транскрипт RGS4 був виявлений у неракових іморталізованих клітинах епітелію поверхні яєчника у рівнях, у декілька тисяч разів вищих за рівень його експресії у клітинних лініях раку яєчника (Hurst et al., 2009).

10 Ген RPS6 кодує рибосомний білок S6, білок цитоплазматичних рибосом, компонент субодиниці 40S рибосом. RPS6 може робити свій внесок у контроль росту і проліферації клітин шляхом селективної трансляції конкретних класів іРНК (RefSeq, 2002). RPS6 є низхідною мішенню mTOR і, як було виявлено, асоціюється з багатьма фізіологічними і патофізіологічними функціями (Chen et al., 2014a). Фосфорилування RPS6 ослаблює пошкодження ДНК і пригнічення розвитку пухлин раку підшлункової залози (Khalaileh et al., 2013).

20 Ген RPS8 кодує рибосомний білок S8, білок рибосом цитоплазми, який є компонентом субодиниці 40S рибосом. Експресія RPS8 підвищена у колоректальних пухлинах і поліпах товстої кишки у порівнянні з відповідною нормальною слизовою оболонкою товстої кишки (RefSeq, 2002). Підвищена експресія RPS8 у пацієнтів з аденокарциномою протоків підшлункової залози корелює з короткою тривалістю життя (Chen et al., 2015).

Ген RPS8P10 кодує псевдоген 10 рибосомного білка S8, псевдоген, який локалізується на хромосомі 15q11.2 (RefSeq, 2002).

25 Ген SCG5 кодує секретогранін V (7B2-білок), нейроендокринний секреторний білок (Portela-Gomes et al., 2008). Подвоєння, що охоплює 3'-кінець гена SCG5 і ділянку до локусу GREM1, може підвищити ризик розвитку колоректального раку (Jaeger et al., 2012; Yang et al., 2014b).

30 Ген SERPINB2 кодує інгібітор серпінпептидази, клада В (овальбумін), члена 2, який інгібує дію активатору плазміногену – позаклітинної протеази урокіназного типу, і тканинного активатору плазміногену (Schroder et al., 2014). SERPINB2 експресується у декількох різних видах пухлин. Експресія SERPINB2 асоціюється зі сприятливим прогнозом при раку молочної залози і підшлункової залози, але з несприятливим прогнозом при раку ендометрію і яєчника і при колоректальному раку (Schroder et al., 2014).

35 Ген SERPINB3 кодує протеазний інгібітор, інгібітор серпінпептидази, клада В (овальбумін), члена 3 (RefSeq, 2002). SERPINB3 є Ras-чутливий фактор, який відіграє важливу роль у Ras-асоційованій продукції цитокінів і пухлиногенезі (Catanzaro et al., 2014). SERPINB3 експресується у високих кількостях у гепатоцелюлярній карциномі (Pontisso, 2014). SERPINB3 асоціюється з розвитком раку яєчника (Lim and Song, 2013).

40 Ген SERPINB4 кодує протеазний інгібітор, інгібітор серпінпептидази, клада В (овальбумін), члена 4 (RefSeq, 2002). SERPINB4 є Ras-чутливий фактор, який відіграє важливу роль у пов'язаній з Ras продукції цитокінів і пухлиногенезі (Catanzaro et al., 2014). SERPINB4 експресується у високих кількостях у гепатоцелюлярній карциномі (Pontisso, 2014).

45 Ген SERPINH1 кодує інгібітор серпінпептидази, клада H (білок 47 теплового шоку), члена 1 (колаген-зв'язувального білка 1), інгібітор серинпротеази. SERPINH1 діє як колаген-специфічний молекулярний шаперон у ендоплазматичному ретикулумі (RefSeq, 2002). SERPINH1 надмірно експресується при багатьох видах раку людини, включаючи рак шлунка, аденокарциному протоків підшлункової залози, гліому, і карциномах, асоційованих з виразковим колітом (Zhao et al., 2014).

50 Ген SEZ6L кодує гомолог білка 6, подібного до мишачого, що має зв'язок з епілептичними нападами, трансмембранного білка з багатьма доменами, які беруть участь у міжбілковій взаємодії і передачі сигналів (Nishioka et al., 2000). SEZ6L є гіперметильованим при раку шлунка (Kang et al., 2008) SEZ6L надмірно експресується у високих кількостях у лініях клітин недрібноклітинного раку легенів і дрібноклітинного раку легенів, а також у зразках первинних пухлин у порівнянні з нормальними тканинами легенів (Gorlov et al., 2007).

55 Ген SLC16A3 кодує члена 3 сімейства переносників розчинених речовин 16, монокарбоксилатний переносник у симпорті з протоном (RefSeq, 2002). У більшості солідних пухлин, як відомо, вироблення енергії базується на гліколізі. Високі швидкості гліколізу призводять до підвищеної продукції лактату, який асоціювався з несприятливим клінічним результатом і прямим внеском у ріст і прогресію пухлин. SLC16A є одним з небагатьох монокарбоксилатних переносників, які прискорюють експорт лактату з ракових клітин (Dhur et

al., 2012; Draoui and Feron, 2011). Експресія SLC16A3 асоціювалася з несприятливим прогнозом у пацієнтів з гепатоцелюлярним раком і підвищеною проліферацією, міграцією і інвазією клітин у експериментах на клітинних лініях (Gao et al., 2014a). Функціональна причетність SLC16A3 до пухлиногенезу була продемонстрована для підгрупи ракових захворювань підшлункової залози (Baek et al., 2014)

Ген MTCL1 кодує фактор 1 утворення поперечних зв'язків між мікротрубочками. Було показано, що MTCL1 бере участь у ремоделюванні мікротрубочок, яке залежить від полярності, і опосередковує реорганізацію нецентросомальних мікротрубочок, специфічну для епітеліальних клітин, шляхом утворення поперечних зв'язків між мікротрубочками (Sato et al., 2013).

Ген SST кодує препробілок гормону соматостатину. Соматостатин експресується по усьому організму і інгібує вивільнення численних вторинних гормонів. Цей гормон є важливим регулятором ендокринної системи шляхом його взаємодії з гіпофізарним гормоном росту, тиреотропним гормоном і більшістю гормонів шлунково-кишкового тракту. Соматостатин впливає також на швидкість нервової передачі у центральній нервовій системі і на проліферацію як нормальних, так і онкогенних клітин (RefSeq, 2002). Аналоги гена SST успішно використовуються і проходять подальші дослідження як терапевтичний підхід до лікування нейроендокринних (карциноїдних) пухлин шлунково-кишкового тракту і підшлункової залози, гепатоцелюлярного раку і раку молочної залози (Pivonello et al., 2014; Culler, 2011; Appetecchia and Baldelli, 2010; Modlin et al., 2010; Watt et al., 2008).

Ген THY1 є кандидатом у гени-супресори пухлин у назофарингеальній карциномі, як носій антиінвазивної активності (Lung et al., 2010).

Ген TSC22D4 кодує білок, який є членом сімейства білків із доменом TSC22, регуляторів транскрипції, що містять структурний мотив "лейцинова застібка-блискавка" (RefSeq, 2002). Рівні TSC22D4 у печінці були підвищені при раковій кахексії (Jones et al., 2013).

Ген TUBA1A кодує альфа-тубулін 1a. Експресія TUBA1A переважно виявлена у морфологічно диференційованих нервових клітинах. Мутації у цьому гені є причиною лісенцефалії 3-го типу (LIS3) – вади нервової системи, яка характеризується мікроцефалією, розумовою відсталістю, виникненням епілепсії у ранньому віці. У основі лісенцефалії лежать дефекти нейрональної міграції (RefSeq, 2002). Порушення регуляції експресії TUBA1A та деяких інших генів, викликані хромосомними перебудовами у трансформованих під дією випромінювання і онкогенних ліній клітин молочної залози, можуть бути віддзеркаленням ранніх молекулярних подій у канцерогенезі молочної залози (Unger et al., 2010). За допомогою порівняльного протеомного аналізу поширеної карциноми серозного епітелію яєчника TUBA1A був ідентифікований як один із потенційних факторів передбачення хіміорезистентності (Kim et al., 2011).

Ген TUBA1B кодує альфа-тубулін 1b (RefSeq, 2002). Різна експресія TUBA1B у комбінації з експресією деяких інших генів асоціювалася з прогнозом при лімфомі з клітин мантийної зони, передбаченням рецидиву у пацієнтів зі стадією II колоректального раку і розрізненням увеальної меланоми з метастазами та без (Blenk et al., 2008; Agesen et al., 2012; Linge et al., 2012). Експресія TUBA1B підвищувалась у тканинах гепатоцелюлярного раку і проліферуючих клітинах гепатоцелюлярного раку. Підвищена експресія TUBA1B була пов'язана з низької загальною виживаністю і резистентністю до паклітакселу у пацієнтів з гепатоцелюлярним раком (Lu et al., 2013a). У клітинах раку яєчника знижена експресія TUBA1B асоціювалася з резистентністю до оксаліплатину (Tummala et al., 2009).

Ген TUBA1C кодує альфа-тубулін 1c (RefSeq, 2002). Було показано, що експресія TUBA1C підвищена при остеосаркомі і гепатоцелюлярному раку, пов'язаному з інфікуванням вірусом гепатиту С, і що вона може бути потенційним біомаркером пухлиногенезу при остеосаркомі або високодиференційованому гепатоцелюлярному раку, пов'язаному з інфікуванням вірусом гепатиту С (Kuramitsu et al., 2011; Li et al., 2010).

Ген TUBA3C кодує альфа-тубулін 3c (RefSeq, 2002). Ген TUBA3D кодує альфа-тубулін 3d (RefSeq, 2002). Ген TUBA4A кодує альфа-тубулін 4a (RefSeq, 2002). За допомогою порівняльного протеомного аналізу пласкоклітинної карциноми стравоходу (ПККС) була показана підвищена експресія TUBA4A (Qi et al., 2005).

Ген TUBA8 кодує альфа-тубулін 8. Мутації у TUBA8 асоціюються з полімікрогірією і з гіпоплазією зорового нерва (RefSeq, 2002). Після лікування фенобарбіталом, негенотоксичним канцерогеном, у печінці мишей індукувалася експресія TUBA8. Було показано, що у клітинних лініях гепатоцелюлярної карциноми надмірна експресія TUBA8 впливає на ріст, проліферацію і міграцію клітин (Kamino et al., 2011).

Ген UCN3 є членом сімейства соувагіну/кортикотропін-вивільнюючого фактору/уротензину I. Він структурно подібний до гена, що кодує кортикотропін-вивільнюючий фактор (КВФ), і продукт, що кодується, є ендogenousним лігандом для рецепторів КВФ типу 2. Можливо, що у головному мозку він є відповідальним за дію стресу на апетит (RefSeq, 2002). Ucn3 виробляється у

нормальних надниркових залозах і їх пухлинах (як у адренкортикальних пухлинах, так і у феохромоцитомах) і діє як аутокринний і паракринний регулятор у нормальних надниркових залозах і їх пухлинах (Takahashi et al., 2006). Урокортин 3 активує метаболічні шляхи AMPK і Akt і підвищує засвоєння глюкози скелетними м'язами щурів (Roustit et al., 2014).

Ген VCAN є членом сімейства протеогліканів, що складається з агрекану і версикану. Білок, що кодується ним, є великим хондроїтинсульфат протеогліканом і являє собою головний компонент позаклітинного матриксу. Цей білок бере участь у клітинній адгезії, проліферації, міграції і ангиогенезі і відіграє головну роль у морфогенезі і підтримці життєдіяльності тканин (RefSeq, 2002). Експресія VCAN регулюється у раково-асоційованих фібробластах рецептором TGF-бета типу II і SMAD-сигнальним каскадом. Підвищена експресія VCAN сприяє рухливості і інвазії клітин раку яєчника за рахунок активації сигнального шляху NF-каппаВ і підвищення рівня експресії CD44, матричної металопротеїнази-9 і рецептора гіалуронан-опосередкованої рухливості (Yeung et al., 2013). Генетичний підпис ремоделювання колагену, включаючи сигнальний шлях TGF-бета, регульований VCAN, асоціювався з метастазами і низькою виживаністю при серозному раку яєчника (Cheon et al., 2014). VCAN виявляє значуще підвищену експресію у КРК у порівнянні з відповідними зразками здорової слизової оболонки товстої кишки і пухлинними тканинами 53 пацієнтів (Pitule et al., 2013).

Ген 16 безкрилого типу сімейства інтеграції MMTV, член 16, кодує секретований сигнальний білок, який бере участь у онкогенезі і у декількох процесах розвитку, включаючи регуляцію спеціалізацію клітин і формування біологічного патерну під час ембріогенезу (RefSeq, 2002). Було показано, що експресія WNT16 є підвищеною при гострому лімфобластному лейкозі (ГЛЛ) з хромосомною транслокацією t(1;19) і відіграє важливу роль у лейкозогенезі (Casagrande et al., 2006; Mazieres et al., 2005). Дослідження клітинних ліній ГЛЛ і зразків, отриманих у пацієнтів з ГЛЛ, показали, що підвищена експресія WNT16 і декількох інших генів-мішеней у сигнальному шляху WNT, викликана метилюванням інгібіторів Wnt, вона також асоціюється зі значуще зниженими 10-річними виживаністю без ознак захворювання і загальною виживаністю (Roman-Gomez et al., 2007).

Ген WNT5A належить до сімейства генів WNT, яке складається з структурно споріднених генів, які кодують сигнальні білки, що секретуються. Ці білки задіяні у онкогенезі і у декількох процесах розвитку, включаючи регуляцію спеціалізацію клітин і формування біологічного патерну під час ембріогенезу. Ген WNT5A кодує члена сімейства генів WNT, який є елементом сигнальних шляхів WNT, як канонічного, так і неканонічного. Цей білок є лігандом для семипрохідного трансмембранного рецептора 5, що завивається, і орфанного тирозинкіназного рецептора 2. Цей білок відіграє суттєву роль у регуляції процесів розвитку зародку під час ембріогенезу. Цей білок може також відігравати певну роль у онкогенезі (RefSeq, 2002). WNT5A надмірно експресується у КРК і має показник зіставності 76 % між первинною пухлинною і метастазами (Lee et al., 2014). Експресія WNT5A підвищена і він є ключовим регулятором епітеліально-мезенхімального переходу і метастазування у клітинах карциноми шлунка людини, назофарингеальної карциноми і раку підшлункової залози (Kanzawa et al., 2013; Zhu et al., 2014; Bo et al., 2013).

Стимуляція імунної відповіді залежить від присутності антигенів, що сприймаються імунною системою хазяїна як чужорідні. Відкриття пухлино-асоційованих антигенів зробило можливим використання імунної системи хазяїна для втручання в ріст пухлини. Зараз вивчається можливість використання для імунотерапії раку різних механізмів задіяння як гуморальної, так і клітинної ланки імунної системи.

Специфічні елементи клітинної імунної відповіді здатні специфічно розпізнавати та знищувати пухлинні клітини. Виділення Т-клітин із популяції пухлино-інфільтруючих клітин або з периферичної крові говорить про те, що такі клітини відіграють важливу роль у природному імунному захисті проти раку. Важливу роль у цій відповіді відіграють, зокрема, CD8-позитивні Т-клітини, які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності I класу (МНС). Ці пептиди зазвичай складаються з 8–10 амінокислотних залишків, що отримані з білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP), які містяться у цитозолі. Молекули МНС людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

Якщо не зазначено інше, під нижче наведеними термінами, що використовуються у цьому описі, розуміються наступні поняття.

Термін "Т-клітинна відповідь" означає специфічну проліферацію та активацію ефекторних функцій, індукованих пептидом *in vitro* чи *in vivo*. Для цитотоксичних Т-клітин, обмежених МНС I класу, ефекторними функціями можуть бути лізис клітин-мішеней, оброблених пептидом чи пептидним прекурсором чи клітин-мішеней, природно презентуючих пептид, секреція цитокінів, переважно гамма-інтерферону, TNF-альфа або ІЛ-2, індукована пептидом, секреція ефекторних молекул, переважно гранзимів чи перфоринів, індукована пептидом, або дегрануляція.

Термін "пептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Бажано, щоб пептиди були довжиною у 9 амінокислот, але можуть бути такими короткими, як довжиною у 8 амінокислот, і такими довгими, як довжиною у 10, 11, 12, 13 або 14 амінокислот або більшими по довжині, а у випадку пептидів, що зв'язані з молекулами МНС II класу (подовжені варіанти пептидів за цим винаходом), вони можуть досягати такої довжини, як 15, 16, 17, 18, 19 або 20 амінокислот.

Термін "пептид" використовується також для позначення солей серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Переважно, щоб ці солі були фармацевтично прийнятними солями пептидів, наприклад, такими як хлорид або ацетат (трифторацетат). Треба зазначити, що солі пептидів за цим винаходом суттєво відрізняються від пептидів у їхньому стані *in vivo*, оскільки пептиди не є солями *in vivo*.

Термін "пептид" повинен також включати "олігопептид". Термін "олігопептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина олігопептиду не є критичною для цього винаходу за умови, що він містить правильний епітоп чи епітопи. Олігопептиди зазвичай коротші, ніж довжиною близько 30 амінокислотних залишків, і довші, ніж довжиною близько 15 амінокислотних залишків.

Термін "поліпептид" використовується для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина поліпептиду не є критичною для цього винаходу за умови, що він містить правильні епітопи. На відміну до термінів "пептид" і "олігопептид", під терміном "поліпептид" маються на увазі молекули, що містять більш ніж 30 амінокислотних залишків.

Пептид, олігопептид, білок або полінуклеотид, що кодує таку молекулу, має назву "імуногенного" (і, отже, є "імуногеном" в межах цього винаходу), якщо він здатний індукувати імунну відповідь. У межах цього винаходу імуногенність точніше визначається як здатність викликати відповідь Т-клітин. Отже, "імуногеном" може бути молекула, яка здатна індукувати імунну відповідь, і що стосується цього винаходу, молекула, що здатна індукувати відповідь Т-клітин. В іншому аспекті імуноген може бути пептидом, комплексом пептиду з МНС, олігопептидом і/або білком, який використовується для продукції специфічних антитіл або ТКР проти нього.

"Епітоп" I класу Т-клітини потребує короткого пептиду, який зв'язаний із рецептором молекули МНС I класу, утворюючи потрійний комплекс (альфа-ланцюг молекули МНС I класу, бета-2-мікроглобулін і пептид), який може розпізнаватися Т-клітиною, що несе відповідний Т-клітинний рецептор, який зв'язується із комплексом МНС/пептид із належної афінністю. Пептиди, які зв'язані з молекулами МНС I класу, зазвичай мають довжину в 8–14 амінокислот, і, найбільш типово, довжину в 9 амінокислот.

У людини є три різні генетичні локуси, які кодують молекули МНС I класу (молекули МНС людини мають також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA)): HLA-A, HLA-B і HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 і HLA-B*07 є прикладами різних алелів МНС I класу, які можуть експресуватися з цих локусів.

Таблиця 9. Частоти експресії F для HLA-A*02 і HLA-A*24 і найбільш поширених серотипів HLA-DR. Частоти, отримані з частот виявлення гаплотипів Gf серед населення США, адаптовано з публікації Mori і співавт. (Mori et al., 1997), з використанням формули Харді-Вайнберга: $F = 1 - (1 - Gf)^2$. Комбінація A*02 або A*24 з певними алелями HLA-DR внаслідок невірноваженого зчеплення може бути збагаченою або збідненою у порівнянні з передбачуваною на основі індивідуальних частот виявлення. Докладну інформацію див. у Chanock і співавт. (Chanock et al., 2004).

Таблиця 10

Алель	Популяція	Фенотип, розрахований із частоти алелів
A*02	Європеоїдна раса (Північна Америка)	49,1 %
A*02	Афроамериканці (Північна Америка)	34,1 %
A*02	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	43,2 %
A*02	Латиноамериканці (Північна Америка)	48,3 %
DR1	Європеоїдна раса (Північна Америка)	19,4 %
DR2	Європеоїдна раса (Північна Америка)	28,2 %
DR3	Європеоїдна раса (Північна Америка)	20,6 %
DR4	Європеоїдна раса (Північна Америка)	30,7 %
DR5	Європеоїдна раса (Північна Америка)	23,3 %
DR6	Європеоїдна раса (Північна Америка)	26,7 %
DR7	Європеоїдна раса (Північна Америка)	24,8 %
DR8	Європеоїдна раса (Північна Америка)	5,7 %
DR9	Європеоїдна раса (Північна Америка)	2,1 %
DR1	Афроамериканці (Північна Америка)	13,20 %
DR2	Афроамериканці (Північна Америка)	29,80 %
DR3	Афроамериканці (Північна Америка)	24,80 %
DR4	Афроамериканці (Північна Америка)	11,10 %
DR5	Афроамериканці (Північна Америка)	31,10 %
DR6	Афроамериканці (Північна Америка)	33,70 %
DR7	Афроамериканці (Північна Америка)	19,20 %
DR8	Афроамериканці (Північна Америка)	12,10 %
DR9	Афроамериканці (Північна Америка)	5,80 %
DR1	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	6,80 %
DR2	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	33,80 %
DR3	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	9,20 %
DR4	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	28,60 %
DR5	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	30,00 %
DR6	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	25,10 %
DR7	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	13,40 %
DR8	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	12,70 %
DR9	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	18,60 %
DR1	Латиноамериканці (Північна Америка)	15,30 %
DR2	Латиноамериканці (Північна Америка)	21,20 %
DR3	Латиноамериканці (Північна Америка)	15,20 %
DR4	Латиноамериканці (Північна Америка)	36,80 %
DR5	Латиноамериканці (Північна Америка)	20,00 %
DR6	Латиноамериканці (Північна Америка)	31,10 %
DR7	Латиноамериканці (Північна Америка)	20,20 %
DR8	Латиноамериканці (Північна Америка)	18,60 %
DR9	Латиноамериканці (Північна Америка)	2,10 %
A*24	Філіппіни	65 %
A*24	Ненці Росії	61 %
A*24:02	Японія	59 %
A*24	Малайзія	58 %
A*24:02	Філіппіни	54 %
A*24	Індія	47 %

Таблиця 11 (продовження)

Алель	Популяція	Фенотип, розрахований із частоти алелів
A*24	Південна Корея	40 %
A*24	Шрі-Ланка	37 %
A*24	Китай	32 %
A*24:02	Індія	29 %
A*24	Західна Австралія	22 %
A*24	США	22 %
A*24	Росія, Самара	20 %
A*24	Південна Америка	20 %
A*24	Європа	18 %

Пептиди за винаходом, переважно якщо введені до складу вакцини за винаходом, як описано в цьому документі, зв'язуються з A*02. Вакцина може також містити пептиди, що універсально зв'язуються з молекулами МНС II класу. Таким чином, вакцина за винаходом може застосовуватися для лікування раку у пацієнтів, що є A*02-позитивними, у той час як немає необхідності вибору алотипів МНС II класу завдяки здатності цих пептидів до універсальності зв'язування.

Якщо пептиди, що зв'язуються з HLA-A*02, поєднати з пептидами, які зв'язуються з іншим алелем, наприклад, A*24, лікуванню можна піддати більший відсоток будь-якої популяції пацієнтів, у порівнянні з охопленням пацієнтів, у яких кожний алель МНС I класу наявний окремо. У той час як у більшості популяцій менше ніж 50 % пацієнтів може бути охоплено кожним алелем окремо, вакцина, що містить пептиди, які є епітопами HLA-A*24 і HLA-A*02, дозволяє вакцинувати принаймні 60 % пацієнтів у кожній відповідній популяції. Конкретно, наступні відсоткові долі пацієнтів будуть позитивними принаймні до одного з цих алелів у різних регіонах: США – 61 %, Західна Європа – 62 %, Китай – 75 %, Південна Корея – 77 %, Японія – 86 % (розраховано з даних www.allele frequencies.net).

У переважному втіленні термін "нуклеотидна послідовність" стосується гетерополімеру дезоксирибонуклеотида.

Нуклеотидна послідовність, що кодує конкретний пептид, олігопептид або поліпептид, може зустрічатися в природі або може бути сконструйована синтетично. Загалом, сегменти ДНК, які кодують пептиди, поліпептиди та білки за цим винаходом, зібрані з фрагментів кДНК і коротких олігонуклеотидних лінкерів або з серії олігонуклеотидів з утворенням синтетичного гена, що здатний експресуватися в рекомбінантній транскрипційній одиниці, що містить регуляторні елементи, які отримані з оперона мікроорганізму або вірусу.

Термін "нуклеотидне кодування пептиду" в контексті цього винаходу означає нуклеотидну послідовність, що кодує пептид, включаючи штучні (створені руками людини) старт- і стоп-кодони, сумісні з біологічною системою, якою ця послідовність буде експресуватися, наприклад, з дендритними клітинами або іншою системою клітин, застосованих для отримання ТКР.

Для цілей цього винаходу посилення на послідовність нуклеїнової кислоти означає як одноланцюгову, так і дволанцюгову нуклеїнову кислоту. Отже, наприклад, для ДНК, конкретна послідовність, якщо контекст на вказує на інше, відноситься до одноланцюгової ДНК такої послідовності, дуплекса такої послідовності з її комплементом (дволанцюгова ДНК) і комплементу такої послідовності.

Термін "кодуюча ділянка" відноситься до тієї частини гена, яка або природно, або нормально кодує продукт експресії цього гена в його природному геномному оточенні, тобто до ділянки, що кодує *in vivo* природний продукт експресії гена.

Кодуюча ділянка може бути ділянкою немутованого ("нормального"), мутованого або зміненого гена, або навіть ділянкою послідовності ДНК або гена, повністю синтезованого в лабораторії з використанням методів, добре відомих фахівцям у галузі синтезу ДНК.

Термін "продукт експресії" означає поліпептид або білок, котрий є природним трансляційним продуктом гена та будь-якої нуклеїново-кислотної послідовності, що кодує еквіваленти, які є результатом виродження генетичного коду, і, таким чином, кодує ту ж амінокислоту (ті ж амінокислоти).

Термін "фрагмент", стосовно кодуючої послідовності, означає частину ДНК, яка містить менш ніж повну кодуючу ділянку, і продукт експресії якої зберігає по суті ту ж біологічну функцію чи активність, що й продукт експресії повної кодуючої ділянки.

Термін "сегмент ДНК" відноситься до полімеру ДНК у формі окремого фрагмента чи як компонент більшої конструкції ДНК, що одержаний з ДНК, виділеної принаймні один раз по суті в чистій формі, тобто без забруднюючих ендogenous матеріалів та в кількості чи концентрації, яка дає змогу ідентифікувати, виконувати маніпуляції та відновлювати сегмент і його складові нуклеотидні послідовності за допомогою стандартних біохімічних методів, наприклад, з використанням вектора клонування. Такі сегменти надаються у формі відкритої рамки зчитування, без порушень внутрішніми нетрансльованими послідовностями, чи інтронів, які зазвичай присутні в еукаріотичних генах. Послідовності нетрансльованих ДНК можуть бути присутні за відкритою рамкою зчитування, де вони не заважають маніпуляціям або експресії кодуючих ділянок.

Термін "праймер" означає коротку нуклеїново-кислотну послідовність, котра може бути спарена з одним ланцюгом ДНК та надає вільний 3'ОН-кінець, на якому ДНК-полімераза починає синтез дезоксирибонуклеотидного ланцюга.

Термін "промотор" означає ділянку ДНК, яка бере участь у зв'язуванні РНК-полімерази для ініціації транскрипції.

Термін "виділений" означає, що матеріал видаляється зі свого первісного середовища (наприклад, природного середовища, якщо він має природне походження). Наприклад, існуючий у природі полінуклеотид чи поліпептид, присутній у живих тваринах, не є виділеним, але той самий полінуклеотид чи поліпептид, відокремлений від якихось чи всіх співіснуючих матеріалів в природній системі, є виділеним. Такі полінуклеотиди можуть бути часткою вектора, і (або) такі полінуклеотиди чи поліпептиди можуть становити частину композиції і все ж таки бути виділеними, якщо такий вектор чи композиція не є частиною свого природного середовища.

Ці полінуклеотиди та рекомбінантні чи імуногенні поліпептиди, розкриті відповідно до цього винаходу, також можуть бути в "очищений" формі. Термін "очищений" не вимагає абсолютної чистоти; скоріше він має відносне значення та може включати препарати високого ступеню очищення або препарати, які тільки частково очищені, в тому сенсі, як спеціалісти в цій галузі розуміють такі терміни. Наприклад, окремі клони, виділені з бібліотеки кДНК, були стандартним чином очищені до електрофоретичної однорідності. Очищення вихідного матеріалу чи природного матеріалу принаймні на порядок величини, переважно на два-три порядки, та більш переважно, на чотири-п'ять порядків величини, чітко передбачається в цьому винаході. Крім того, заявлений поліпептид, котрий має чистоту переважно в 99,999, або принаймні в 99,99 % чи 99,9 %; і навіть бажано 99 % за масою чи більше, також чітко пропонується у винаході.

Нуклеїнові кислоти та поліпептиди як продукти експресії, що розкриваються відповідно до цього винаходу, а також вектори експресії, які містять такі нуклеїнові кислоти і (або) такі поліпептиди, можуть бути в "збагаченій формі". Термін "збагачений" в тому виді, в якому він використовується тут, означає, що концентрація матеріалу принаймні приблизно в 2, 5, 10, 100 або 1000 разів перевищує його природну концентрацію (наприклад, бажано 0,01 %, за масою, принаймні краще приблизно 0,1 % за масою. Також мають на увазі збагачені препарати приблизно в 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % та 20 % за масою. Послідовності, конструкції, вектори, клони та інші матеріали, які складають цей винахід, можуть, що більш сприятливо, бути у збагаченій чи виділеній формі. Термін "активний фрагмент" означає фрагмент, зазвичай пептиду, поліпептиду або нуклеїново-кислотної послідовності, що генерує імунну реакцію (тобто має імуногенну активність) при введенні індивідуально чи, необов'язково, з прийнятим ад'ювантом або у векторі, тварині, наприклад, ссавцю, такому як кролик чи миша, і також включаючи людину, до того ж така імунна реакція має вид стимуляції Т-клітинної відповіді у тварини-реципієнта, такої як людина. Альтернативно, "активний фрагмент" також може використовуватись для індукції Т-клітинної відповіді *in vitro*.

В цьому винаході терміни "частка", "сегмент" і "фрагмент", якщо вони використовуються по відношенню до поліпептидів, означають безперервну послідовність залишків, таких як амінокислотні залишки, причому ця послідовність утворює підгрупу більшої послідовності. Наприклад, якщо поліпептид був підданий обробці будь-якою з типових ендopeптидаз, таких як трипсин або хімотрипсин, олігопептиди, одержані в результаті такої обробки, будуть представляти частки, сегменти чи фрагменти початкового поліпептиду. Якщо такі терміни використовуються стосовно полінуклеотидів, вони означають продукти, одержані після обробки згаданих полінуклеотидів будь-якою з типових ендонуклеаз.

Відповідно до цього винаходу, термін "відсоткова ідентичність" або "відсоток ідентичності" відносно послідовності означає, що послідовність порівнюється із заявленою або описаною

послідовністю після вирівнювання послідовності, яка порівнюється ("Послідовність, що порівнюється"), з описаною або заявленою послідовністю ("Контрольна послідовність"). Відсоткова ідентичність визначається відповідно до наведеної нижче формули:

$$\text{Відсоткова ідентичність} = 100 [1 - (C/R)]$$

де С - кількість відмінностей між Контрольною послідовністю та Послідовністю, що порівнюється, на довжині вирівнювання між Контрольною послідовністю та Послідовністю, що порівнюється, де

(i) кожна основа чи амінокислота в Контрольній послідовності, котра не має відповідної вирівняної основи чи амінокислоти у Послідовності, що порівнюється, і

(ii) кожний розрив у Контрольній послідовності та

(i) кожна вирівняна основа чи амінокислота в Контрольній послідовності, котра не має відповідної вирівняної основи чи амінокислоти у Послідовності, що порівнюється, становить відмінність, і

(iii) вирівнювання повинне починатися з позиції 1 вирівняних послідовностей;

і R є числом основ або амінокислот у Контрольній послідовності по довжині вирівнювання з Послідовністю, що порівнюється, причому будь-який розрив, створений у Контрольній послідовності, також вважається основою або амінокислотою.

Якщо існує вирівнювання між Послідовністю, що порівнюється, та Контрольною послідовністю, для якої відсоткова ідентичність, що розрахована вище, є приблизно рівною чи більшою, ніж зазначена мінімальна Відсоткова ідентичність, то Послідовність, що порівнюється, має зазначену мінімальну відсоткову ідентичність до Контрольної послідовності, хоча можуть існувати вирівнювання, в яких розрахована, як описано вище, Відсоткова ідентичність є меншою, ніж зазначена Відсоткова ідентичність.

Як згадано вище, цей винахід також стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або їхній варіант, який на 88 % є гомологічним послідовностям від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або їхнього варіанту, який викликає перехресну реакцію Т-клітин із зазначеним пептидом. Пептиди за винаходом здатні зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I класу, або подовжені версії згаданих пептидів – з молекулою II класу.

У цьому винаході термін "гомологічний" означає ступінь ідентичності (див. "Відсоткова ідентичність" вище) послідовностей двох амінокислотних послідовностей, тобто пептидних або поліпептидних послідовностей. Згадана вище "гомологія" визначається порівнянням двох послідовностей, що були вирівняні в оптимальних умовах щодо послідовностей, які порівнюються. Таку гомологічність послідовностей можна розрахувати, створивши вирівнювання за допомогою, наприклад, алгоритму ClustalW. Загальнодоступне програмне забезпечення для аналізу послідовностей, більш конкретно, Vector NTI, GENETYX або інші інструменти можна знайти у базах даних у вільному доступі.

Фахівець у цій галузі в змозі оцінити, чи будуть Т-клітини, індуковані варіантом конкретного пептиду, вступати в перехресну реакцію із самим пептидом (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Під терміном "варіант" даної амінокислотної послідовності автори винаходу мають на увазі, що бокові ланцюги, наприклад, одного чи двох амінокислотних залишків змінюються (зокрема, шляхом заміни їх боковим ланцюгом залишку іншої природно існуючої амінокислоти чи якимось іншим боковим ланцюгом) таким чином, що пептид все ще здатний зв'язуватися з молекулою HLA, по суті, у такий же спосіб, як і пептид, що складається з даної амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67. Наприклад, пептид може бути модифікований так, що він буде принаймні зберігати, чи навіть поліпшувати, здатність взаємодіяти та зв'язуватися зі зв'язувальною щільною прийнятною молекулою МНС, такої як HLA-A*02 або -DR, і у такий спосіб принаймні зберігати чи навіть поліпшувати здатність зв'язуватися з ТКР активованих Т-клітин.

Ці Т-клітини можуть згодом вступати в перехресну реакцію із клітинами і знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду як визначено в аспектах цього винаходу. Як можна дізнатися з наукових публікацій і баз даних (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), окремі позиції пептидів, що зв'язують HLA, є типово якірними залишками, які формують ключову послідовність, що відповідає зв'язувальному мотиву рецептора HLA, який визначається полярністю, електрофізичними, гідрофобними властивостями і просторовою структурою поліпептидних ланцюгів, що утворюють зв'язувальну щільну. Отже, фахівець у цій галузі зможе модифікувати амінокислотну послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO 67, зберігаючи відомі якірні залишки, і буде здатний визначити, чи зберігають такі варіанти здатність зв'язувати молекули МНС I або II класу. Варіанти за цим винаходом зберігають здатність зв'язуватися з ТКР активованої Т-

клітини, який потім може вступати в перехресну реакцію з- і знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду як визначено в аспектах винаходу.

Первісні (немодифіковані) пептиди, що розкриваються в цьому винаході, можуть модифікуватися заміщенням одного чи кількох залишків на різних, можливо, селективних, ділянках пептидного ланцюга, якщо не зазначено інакше. Переважно, щоб ці заміщення знаходилися на кінці амінокислотного ланцюга. Такі заміщення можуть бути консервативного характеру, наприклад, коли одна амінокислота замінюється амінокислотою подібної структури та характеристик, наприклад, коли гідрофобна амінокислота замінюється іншою гідрофобною амінокислотою. Навіть більш консервативною буде заміна амінокислот такого ж чи подібного розміру та хімічного характеру, наприклад, коли лейцин замінюється на ізолейцин. В дослідженнях варіацій послідовностей в сімействах природних гомологічних білків певні амінокислотні заміщення допускаються частіше, ніж інші, і вони часто демонструють кореляцію зі схожістю за розміром, зарядом, полярністю та гідрофобністю між первісною амінокислотою та її заміною, і це є основою для визначення "консервативних заміщень".

Консервативні заміщення визначаються в цьому документі як обмін в межах однієї з наведених нижче п'яти груп: група 1 – малі аліфатичні, неполярні чи слабо полярні залишки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); група 2 – полярні, негативно заряджені залишки та їх аміді (Asp, Asn, Glu, Gln); група 3 – полярні, позитивно заряджені залишки (His, Arg, Lys); група 4 – великі аліфатичні неполярні залишки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); та група 5 - великі ароматичні залишки (Phe, Tyr, Trp).

Менш консервативні заміщення можуть включати заміну однієї амінокислоти іншою, котра має подібні характеристики, але дещо відрізняється за розміром, наприклад, заміна аланіну залишком ізолейцину. Високо-неконсервативні заміни можуть включати заміщення кислоти амінокислоти полярною, або навіть такою, що є основною за своїм характером. Такі "радикальні" заміщення не можуть, однак, відхилятися як потенційно неефективні, оскільки їх хімічні наслідки не є повністю прогнозованими, та радикальні заміщення також можуть несподівано призвести до сприятливих ефектів, які неможливо передбачити за простими хімічними принципами.

Звичайно, такі заміщення можуть включати структури, що відрізняються від звичайних L-амінокислот. Отже, D-амінокислоти можуть заміщуватися L-амінокислотами, котрі зазвичай виявляються в антигенних пептидах цього винаходу та все ж охоплюються розкриттям в ньому. Крім того, нестандартні амінокислоти (тобто інші, ніж стандартні амінокислоти природних білків), також можуть використовуватися для заміщення з метою отримання імуногенів та імуногенних поліпептидів відповідно до цього винаходу.

Якщо виявляється, що заміщення в більш ніж одній позиції приводять до утворення пептиду по суті з еквівалентною чи більшою антигенною активністю, як визначено нижче, тоді комбінації цих заміщень будуть досліджуватися з метою визначення, чи мають комбіновані заміщення додатковий чи синергічний вплив на антигенність пептиду. Як правило, в пептиді замінюються одночасно не більш ніж 4 позиції.

Пептид, що по суті складається з амінокислотної послідовності як зазначено у цьому документі, може мати одну або дві неякірні амінокислоти (див. нижче пояснення щодо якірного мотиву), що були замінені без того, щоб здатність пептиду зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу суттєво змінилася або піддалася негативному впливу у порівнянні з немодифікованим пептидом. У іншому пептиді, що складається або по суті складається з цієї амінокислотної послідовності як зазначено у цьому документі, одна або дві амінокислоти можуть бути замінені партнерами по консервативній заміні (також див. нижче у цьому документі) без того, щоб здатність пептиду зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу суттєво змінилася або піддалася негативному впливу у порівнянні з немодифікованим пептидом.

Ті амінокислотні залишки, що не є суттєвими для взаємодії з Т-клітинним рецептором, можуть бути модифіковані шляхом заміни іншою амінокислотою, введення якої не має суттєвого впливу на реактивність Т-клітин та не виключає зв'язування із відповідним МНС. Отже, за винятком зазначеної умови, пептид за винаходом може бути будь-яким пептидом (до цього терміну автори винаходу відносять олігопептид чи поліпептид), котрий включає амінокислотні послідовності або їхню частину чи її варіант, як він є.

Таблиця 12

Варіанти і мотив пептидів відповідно до SEQ ID NO: 4, 29 і 30

Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 4	S	V	D	V	S	P	P	K	V
Варіанти									I
									L
									A
		L							I
		L							L
		L							
		L							A
		A							I
		A							L
		A							
		A							A
		M							I
		M							L
		M							
		M							A
		T							I
		T							L
		T							
		T							A
		Q							I
		Q							L
		Q							
		Q							A
Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 29	F	L	Q	E	Y	L	D	A	I
Варіанти		I							L
		I							V
		I							
		I							A
		M							L
		M							V
		M							
		M							A
		A							L
		A							V
		A							
		A							A
		V							L
		V							V
		V							
		V							A
		T							L
		T							V
		T							

Таблиця 13 (продовження)

Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		T							A
		Q							L
		Q							V
		Q							
		Q							A
Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 30	V	V	D	E	G	P	T	G	V
Варіанти									L
									I
									A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		L							L
		L							I
		L							
		L							A
		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A

Більш довгі (подовжені) пептиди також можуть бути придатними. Можливо, щоб епітопи комплексу МНС І класу, хоча вони мають зазвичай довжину 8–11 амінокислот, утворювались шляхом процесингу з більш довгих пептидів чи білків, які включають фактичний епітоп. Бажано, 5 щоби бокові залишки фактичного епітопу не завдавали значного впливу на протеолітичне розщеплення, необхідне для презентації фактичного епітопу під час процесингу.

Пептиди за цим винаходом можуть бути подовжені аж до чотирьох амінокислот, тобто 1, 2, 3 або 4 амінокислоти можуть біти додані до будь-якого кінця у будь-якій комбінації між 4:0 і 0:4. 10 Комбінації подовжень за цим винаходом можуть бути проілюстровані у Таблиці 7.

Таблиця 14

Комбінації подовжень у пептидах за цим
винаходом

С-кінець	N-кінець
4	0
3	0 або 1
2	0, або 1, або 2

Таблиця 15 (продовження)

C-кінець	N-кінець
1	0, або 1, або 2, або 3
0	0, або 1, або 2, або 3, або 4
N-кінець	C-кінець
4	0
3	0 або 1
2	0, або 1, або 2
1	0, або 1, або 2, або 3
0	0, або 1, або 2, або 3, або 4

Амінокислотами для подовжень/елонгацій можуть бути пептиди вихідної послідовності білка або будь-яка інша амінокислота (будь-які інші амінокислоти). Подовження може використовуватися для підвищення стабільності або розчинності пептидів.

Отже, епітопи відповідно цього винаходу можуть бути ідентичними природним пухлино-асоційованим та пухлино-специфічним епітопам або можуть включати епітопи, які відрізняються не більше ніж на чотири залишки від контрольного пептиду, за умови, що вони мають по суті ідентичну антигенну активність.

У альтернативному втіленні пептид є подовженим з будь-якого або з обох боків на більш ніж 4 амінокислоти, переважно до загальної довжини аж до 30 амінокислот. Це може привести до утворення пептидів, що зв'язуються з молекулами МНС II класу. Зв'язування з молекулами МНС II класу може бути перевірено методами, відомими в цій галузі.

Відповідно, за цим винаходом також пропонуються пептидні епітопи і епітопи пептидних варіантів, що зв'язуються з молекулами МНС I класу, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину від 8 до 100, переважно від 8 до 30, та найбільш переважно від 8 до 14, а саме 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 амінокислот, а у випадку подовжених пептидів, що зв'язуються з молекулами HLA II класу, вони можуть також досягати довжини 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 або 22 амінокислоти.

Зрозуміло, що пептид або його варіант за цим винаходом здатний зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу. Зв'язування пептиду або його варіанту з комплексом МНС може бути досліджено методами, відомими в цій галузі.

Переважно, коли Т-клітини, специфічні по відношенню до пептиду за цим винаходом, досліджують у порівнянні із заміщеними пептидами, причому концентрація пептиду, за якої заміщені пептиди досягають половини максимального росту лізису відносно фонових значень, є не більше ніж 1 мМ, переважно не більше ніж 1 мкМ, ще більш переважно не більше ніж приблизно 1 нМ, і ще більш переважно не більше ніж приблизно 100 пМ, і найбільш переважно не більше ніж приблизно 10 пМ. Переважно також, щоб заміщений пептид розпізнавався Т-клітинами, отриманими від більш ніж однієї особи, принаймні двох, і більш переважно трьох осіб.

У особливо переважному втіленні цього винаходу пептид складається або по суті складається з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67.

"По суті складається з" означає, що пептид за винаходом, на додаток до послідовності відповідно до будь-якої послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO 67, чи його варіант, містить додаткові N- і (або) C-термінальні фрагменти послідовності амінокислот, які не обов'язково формують частину пептиду, що функціонує як епітоп для молекул МНС.

Проте ці фрагменти можуть бути важливими для забезпечення ефективного введення пептиду відповідно до цього винаходу в клітини. В одному з втілень цього винаходу пептид є частиною гібридного білка, який містить, наприклад, 80 N-термінальних амінокислот HLA-DR-антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (p33, надалі "Ii"), одержаного з NCBI, інвентарний номер в генному банку (GenBank) X00497. У інших злиттях пептиди за цим винаходом можуть бути злиті з антитілом, як описано в цьому документі, або з його функціональною частиною, зокрема з послідовністю антитіла, щоби бути специфічно націленими згаданими антитілами, або, наприклад, злиті з антитілом або з послідовністю антитіла, що є специфічним до дендритних клітин, як описано в цьому документі.

Крім того, пептид чи його варіант може бути додатково модифікований для поліпшення його стабільності і (або) зв'язку з молекулами МНС, щоб викликати сильнішу імунну відповідь.

Методи такої оптимізації пептидної послідовності добре відомі в цій галузі та включають, наприклад, введення реверсованих пептидних зв'язків чи непептидних зв'язків.

В реверсованому пептидному зв'язку амінокислотні залишки не з'єднуються пептидними зв'язками (-CO-NH-), а пептидний зв'язок реверсується. Такі ретро-інверсивні пептидні міметики можуть бути отримані методами, відомими в даній галузі, наприклад, описаними в роботі Meziere і співавт. (1997) (Meziere et al., 1997), яка включена в цей документ шляхом посилання. Такий підхід включає формування псевдо-пептидів, які містять зміни із залученням остова, а не орієнтації бокових ланцюгів. Meziere і співавт. (Meziere et al., 1997) показують, що для відповіді МНС і Т-клітин-хелперів зазначені псевдо-пептиди є прийнятними. Ретро-інверсивні пептиди, які містять зв'язки NH-CO замість пептидних зв'язків CO-NH, набагато більш стійкі до протеолізу.

Непептидний зв'язок – це, наприклад, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- та -CH₂SO-. У патенті США 4 897 445 пропонується метод твердофазного синтезу непептидних зв'язків (-CH₂-NH) в поліпептидних ланцюгах, що включає поліпептиди, синтезовані за допомогою стандартних методик, та непептидний зв'язок, синтезований шляхом реакції аміноальдегіду та амінокислоти в присутності NaCNBH₃.

Пептиди, що включають послідовності, описані вище, можуть бути синтезовані з додатковими хімічними групами, присутніми на їхніх аміно- і (або) карбоксильних кінцях, для посилення стабільності, біологічної доступності і (або) афінності пептидів. Наприклад, гідрофобні групи, такі як карбобензоксильні, данзильні чи трет-бутилоксикарбонільні, можуть додаватися до аміно-кінців пептидів. Подібним чином, на аміно-кінцях пептидів може розміщуватись ацетильна група чи 9-флуоренілметоксикарбонільна група. До карбоксильних кінців пептидів може бути додана також гідрофобна група, трет-бутилоксикарбонільна чи амідогрупа.

Крім того, пептиди за винаходом можуть бути синтезовані для зміни їхньої просторової конфігурації. Наприклад, може використовуватися D-ізомер одного чи кількох амінокислотних залишків пептиду, а не звичайний L-ізомер. До того ж, принаймні один з амінокислотних залишків пептидів за винаходом може замінюватись одним з добре відомих амінокислотних залишків неприродного походження. Такі заміни можуть служити для підвищення стабільності, біологічної доступності і (або) здатності до зв'язування пептидів за винаходом.

Подібним чином, пептид чи його варіант за винаходом може модифікуватися хімічно, шляхом реакції окремих амінокислот до чи після синтезу пептиду. Приклади таких модифікацій добре відомі в цій галузі та узагальнені, зокрема, в роботі R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), яка включена в цей документ шляхом посилання. Хімічна модифікація амінокислот включає, але не обмежується ними, модифікацію шляхом ацилювання, амідинування, піридоксильовання лізину, відновлювального алкілювання, тринітробензилювання аміногруп 2,4,6-тринітробензолсульфоною кислотою (TNBS), амідну модифікацію карбоксильних груп та сульфгідрильну модифікацію шляхом окиснення пермурашиною кислотою цистеїну в цистеїнову кислоту, формування похідних ртуті, утворення змішаних дисульфідів з іншими тиольними сполуками, реакцію з імідом малеїнової кислоти, карбоксиметилування йодоцтовою кислотою чи йодацетамідом та карбамоїлювання ціанатом при лужному рН, хоча способи модифікації не обмежуються наведеними тут. В цьому відношенні досвідчений фахівець може звернутися до Глави 15 публікації Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995), де докладно описано методику відносно хімічної модифікації білків.

Стисло, модифікація, наприклад, аргінільних залишків часто базується на реакції віцинальних дикарбонільних сполук, таких як фенілглюксаль, 2,3-бутандіон і 1,2-циклогександіон, з утворенням адукту. Іншим прикладом є реакція метилглюксалю з аргініновими залишками. Цистеїн може бути модифікований без супутньої модифікації інших нуклеофільних сайтів, таких як лізин та гістидин. В результаті велика кількість реагентів є доступною для модифікації цистеїну. Веб-сайти таких компаній, як Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>), надають інформацію щодо конкретних реагентів.

Селективне відновлення дисульфідних зв'язків також є поширеним. Дисульфідні зв'язки можуть утворюватися і окислюватися під час теплової обробки біофармацевтичних препаратів. К-реагент Вудворда може використовуватися для модифікації деяких залишків глутамінової кислоти. N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіїмід може використовуватися для утворення внутрішньомолекулярних зшивок між залишками лізину і глутамінової кислоти. Наприклад, діетилпірокарбонат є реагентом для модифікації гістидильних залишків у білках. Для модифікації гістидину може також використовуватися 4-гідрокси-2нонєналь. Реакція залишків лізину та інших альфа-аміногруп є, наприклад, прийнятною для зв'язування пептидів до поверхонь або поперечного зшивання білків/пептидів. Лізин є сайтом для прикріплення

поліетиленгліколю і головним сайтом модифікації при глікозилюванні білків. Метіонінові залишки у білках можна модифікувати, наприклад, йодацетамідом, брометиламіном і хлораміном Т.

5 Тетранітрометан і N-ацетилімідазол можуть використовуватися для модифікації тирозильних залишків. Поперечне зшивання шляхом утворення дитирозину може здійснюватися пероксидом водню/іонами міді.

У недавніх дослідженнях модифікації триптофану використовувалися N-бромсукцинімід, 2-гідрокси-5-нітробензилбромід або 3-бром-3-метил-2-(2-нітрофенілмеркапто)-3H-індол (BNPS-скатол).

10 Успішна модифікація ПЕГ (поліетиленгліколем) терапевтичних білків та пептидів, що часто асоціюється з подовженням напівперіоду циркуляції при перехресному зшиванні білків із глутаральдегідом, поліетиленглікольдіакрилатом та формальдегідом, використовується для приготування гідрогелів. Хімічна модифікація алергенів для використання в імунотерапії часто досягається шляхом карбамоїлування ціанатом калію.

15 Пептид чи його варіант, де пептид є модифікованим або включає непептидні зв'язки, є переважним втіленням цього винаходу. Загалом, пептиди і їх варіанти (принаймні такі, що містять пептидні зв'язки між амінокислотними залишками) можуть бути синтезовані Fmoc-поліамідним методом твердофазного синтезу пептидів, як це розкрито у роботі Lukas і співавт. (Lukas et al., 1981) і в посиланнях, що є в ній. Тимчасовий захист N-аміногрупи забезпечується 20 9-флуоренілметилокискарбонільною (Fmoc) групою. Повторювальне розщеплення цієї дуже нестійкої до дії луг захисної групи виконується за допомогою 20 % піперидину у N, N-диметилформаміді. Можна захистити функціональні групи бокових ланцюгів, такі як бутилові етери (у випадку серину, треоніну та тирозину), бутилові естери (у випадку глутамінової кислоти і аспарагінової кислоти), бутилокискарбонільне похідне (у випадку лізину і гістидину), тритильне похідне (у випадку цистеїну) і 4-метокси-2,3,6-триметилбензосульфонільне похідне (у випадку 25 аргініну). У сполуках, в яких C-термінальними залишками є глутамін або аспарагін, для захисту амідогруп бокових ланцюгів використовують 4,4'-диметоксибензгідрильну групу. Основою твердофазного носія є полідиметилакриламідний полімер, що складається з трьох мономерів: диметилакриламід (каркасний мономер), біс-акрилоїлетилендіаміну (компонент для перехресного зшивання) і акрилоїлсаркозинметилового естеру (функціоналізуючий агент). Як агент, що утворює зв'язок пептиду і смоли, який піддається розщепленню, використовується нестійке до дії кислот похідне 4-гідроксиметилфеноксистої кислоти. Всі амінокислотні похідні додають у вигляді заздалегідь синтезованих симетричних ангідридних похідних за винятком аспарагіну і глутаміну, які додають з використанням зворотної N, N-дициклогексилкарбодіімід/1-гідроксибесотриазол-опосередкованої реакції сполучення. Усі реакції сполучення і зняття захисту відслідковували за допомогою методів контролю з використанням нінгідрину, тринітробензолсульфонової кислоти і ізотину. Після завершення синтезу пептиди відщеплюють від смоли-носія з супутнім видаленням захисних груп бокових ланцюгів шляхом обробки 95 % трифтороцтовою кислотою, що містить 50 % суміші поглиначів. Зазвичай використовувані поглиначі включають етандитіол, фенол, анізол і воду, конкретний вибір залежить від 40 амінокислотних складових пептиду, що синтезується. Для синтезу пептидів можливе також використання комбінації твердофазних і рідкофазних методик (див., наприклад, (Bruckdorfer et al., 2004) і посилання, наведені в цій роботі).

45 Трифтороцтову кислоту видаляють випаровуванням у вакуумі з подальшим подрібнюванням із діетиловим етером, що забезпечує отримання сирого пептиду. Будь-які поглиначі, які присутні в матеріалі, видаляються простою процедурою екстракції, яка після ліофілізації водної фази дозволяє отримати сирий пептид, вільний від поглиначів. Реагенти для синтезу пептидів, як правило, можна придбати, наприклад, у компанії Calbiochem-Novabiochem (Нотінгем, Велика Британія).

50 Очищення може виконуватися за допомогою одного будь-якого методу або їх комбінації, таких як перекристалізація, ексклюзійна хроматографія, іонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобної взаємодії та (зазвичай) зворотно-фазна вискоєфективна рідинна хроматографія із градієнтним розділенням, наприклад, з використанням системи ацетонітрil/вода.

55 Аналіз пептидів може виконуватися за допомогою тонкошарової хроматографії, електрофорезу, зокрема, капілярного електрофорезу, твердофазної екстракції (ТФЕ), зворотно-фазної вискоєфективної рідинної хроматографії, амінокислотного аналізу після кислотного гідролізу та мас-спектрометрії із бомбардуванням прискореними атомами (FAB), а також мас-спектрометричного аналізу MALDI та ESI-Q-TOF.

Щоб вибрати надмірно презентовані пептиди, розраховується профіль презентації, який дозволяє оцінити медіану презентації у зразку, а також варіацію повторних вимірювань. Профіль зіставляє зразки пухлини, що вивчається, з фоновим рівнем зразків нормальних тканин. Кожний із цих профілів можна потім консолідувати у показник надмірної презентації, підрахувавши р-значення за допомогою лінійної моделі змішаних ефектів (Pinheiro et al., 2015), з поправкою на багаторазове тестування за методом оцінки долі хибних відхилень (Benjamini and Hochberg, 1995).

З метою ідентифікації і відносного кількісного визначення HLA-лігандів методом мас-спектрометрії молекули HLA зразків тканин після шоквої заморозки були очищені, і були виділені пептиди, що зв'язуються з молекулами HLA. Виділені пептиди були розділені, а їх послідовності були ідентифіковані методом рідинної хроматографії і мас-спектрометрії (PX-MC) у режимі реального часу з іонізацією у наноелектроспреї. Отримані пептидні послідовності були перевірені порівнянням шаблону фрагментації природних TUMAP, записаного для зразків раку підшлункової залози (N=18 A*02-позитивних зразків), із шаблонами фрагментації відповідних синтетичних контрольних пептидів із ідентичними послідовностями. Оскільки було безпосередньо виявлено, що пептиди є лігандами молекул HLA на клітинах первинних пухлин, ці результати надали прямі докази природного процесингу і презентації ідентифікованих пептидів на тканинах первинних ракових пухлин, отриманих від 18 пацієнтів, хворих на рак підшлункової залози.

Патентовані інформаційні канали з наукової розробки XPRESIDENT® v2.1 (див., наприклад, заявку США 2013-0096016, яка таким чином включена в цей документ шляхом посилання в усій повноті) дозволяють ідентифікувати і виділяти відповідні кандидати у вакцини на базі надмірно презентованих пептидів, застосовуючи метод прямого відносного кількісного визначення рівнів HLA-рестрикованих пептидів на ракових тканинах у порівнянні з декількома різними нераковими тканинами і органами. Цього вдалося досягти за рахунок розробки методу диференційного кількісного визначення на основі даних PX-MC без використання ізотопної мітки, що були оброблені патентованими інформаційними каналами аналізу даних, в яких об'єднані алгоритми для ідентифікації послідовностей, спектральної кластеризації, підрахунку іонів, вирівнювання часу утримання, деконволюції за зарядовими станами і нормалізації.

Були встановлені рівні презентації, включаючи оцінку похибок для кожного пептиду і зразка. Були ідентифіковані пептиди, що презентуються виключно на пухлинних тканинах, і пептиди, надмірно презентовані на пухлинних тканинах у порівнянні з нераковими тканинами і органами.

Комплекси HLA-пептид, отримані із зразків тканин раку підшлункової залози, були очищені, і пептиди, зв'язані з молекулами HLA, були виділені і проаналізовані методом PX-MC (див. приклади). Усі досліджувані TUMAP були за допомогою цього підходу ідентифіковані на зразках пухлин первинного раку підшлункової залози, що підтвердило факт їх презентації на клітинах первинного раку підшлункової залози.

Ідентифіковані на тканинах багатьох пухлин раку підшлункової залози і на нормальних тканинах TUMAP були кількісно визначені методом PX-MC без застосування ізотопних міток з реєстрацією спектрів у режимі підрахунку іонів. Цей метод базується на припущенні, що площі піків PX-MC пептиду корелюють з його кількістю у зразку. Усі сигнали, які залежать від кількості пептиду, у різних експериментах за методом PX-MC, були нормалізовані на основі середніх значень, усереднені по зразках і злиті у гістограму, що має назву профілю презентації. Профіль презентації об'єднує дані різних методів аналізу, таких як пошук по базах даних для білків, спектральної кластеризації, деконволюції за зарядовими станами (розрядження) і вирівнювання часу утримання і нормалізації.

Предметом цього винаходу є пептиди для лікування раку та інших пухлин, переважно раку підшлункової залози, які надмірно чи виключно презентують пептиди за цим винаходом. Ці пептиди, за даними мас-спектрометрії, презентуються природно молекулами HLA на зразках тканин первинного раку підшлункової залози людини.

Вихідний ген/білок (який також визначається як "повнорозмірний білок" або "базовий білок"), із якого отримані пептиди, як було показано, відзначається високою надекспресією у клітинах раку у порівнянні з нормальними тканинами – "нормальні тканини" у контексті даного винаходу означає або клітини здорової підшлункової залози, або клітини інших здорових тканин, що свідчить про високий ступінь зв'язку пухлин із вихідними генами (див. Приклад 2). Більш того, самі пептиди дуже надмірно презентуються на тканинах пухлини – "пухлинні тканини" у контексті даного винаходу означає зразок від пацієнта, що страждає на рак підшлункової залози, але не на нормальних тканинах (див. Приклад 1).

Зв'язані з HLA пептиди можуть розпізнаватися імунною системою, а саме Т-лімфоцитами. Т-клітини можуть руйнувати клітини, що презентують розпізнаний комплекс HLA/пептид, наприклад, клітини раку підшлункової залози, що презентують отримані пептиди.

Було показано, що пептиди за цим винаходом здатні стимулювати відповідь Т-клітин і (або) надмірно презентуються, і, таким чином, можуть використовуватися для отримання антитіл і (або) ТКР, таких як розчинні ТКР, за цим винаходом (див. Приклад 3, Приклад 4). Більш того, пептиди, якщо вони утворюють комплекси з відповідними молекулами МНС, також можуть використовуватися для продукції антитіл і (або) ТКР, особливо рТКР за цим винаходом. Відповідні способи добре відомі фахівцю у цій галузі, і їх описи можна знайти також у відповідній літературі. Отже, пептиди за цим винаходом можуть використовуватись для генерації імунної відповіді організму пацієнта, завдяки чому клітини пухлини можуть бути зруйновані. Імунна відповідь організму пацієнта може індукуватися прямим введенням пацієнту описаних пептидів або відповідних прекурсорних речовин (наприклад, подовжених пептидів, білків або нуклеїнових кислот, які кодують ці пептиди), ідеально в комбінації з агентом, що підвищує імунну реакцію (тобто ад'ювантом). Можна очікувати, що імунна відповідь, що виникає в результаті такої терапевтичної вакцинації, є високо специфічною по відношенню до клітин пухлини, оскільки цільові пептиди за цим винаходом не є присутніми на нормальних тканинах у достатній кількості копій, що попереджає ризик небажаних аутоімунних реакцій проти нормальних клітин в організмі пацієнта.

"Фармацевтична композиція" є переважно композицією, прийнятною для введення людині у медичній установі. Переважно, фармацевтична композиція є стерильною і виробляється відповідно до вимог належної виробничої практики (GMP).

Фармацевтичні композиції включають пептиди або у вільній формі, або у формі фармацевтично прийнятної солі (див. також вище). Термін "фармацевтично прийнятна сіль" в контексті цього винаходу означає похідну сполуку розкритих пептидів, в якій пептид модифікується шляхом створення кислоти чи основної солі речовини. Наприклад, кислі солі готуються з вільної основи (як правило, де нейтральна форма лікарського засобу має нейтральну $-NH_2$ -групу), за участю реакції з прийнятною кислотою. Прийнятні кислоти для приготування кислих солей включають органічні кислоти, такі, наприклад, як оцтова кислота, пропіонова кислота, гліколева кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, яблучна кислота, малінова кислота, бурштинова кислота, малеїнова кислота, фумарова кислота, винна кислота, лимонна кислота, бензойна кислота, корична кислота, мигдальна кислота, метансульфофосфат, етансульфофосфат, п-толуолсульфофосфат, саліцилова кислота і т. ін., а також неорганічні кислоти, наприклад, соляна кислота, бромистоводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота і т. ін. І навпаки, приготування основних солей кислотних компонентів, які можуть бути присутніми на пептиді, здійснюється з використанням фармацевтично прийнятної основи, такої як гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид амонію, гідроксид кальцію, триметиламін і тому подібні.

В особливо переважному втіленні фармацевтичні композиції містять пептиди у вигляді солей оцтової кислоти (ацетати), трифторацетатів або солей соляної кислоти (хлориди).

Переважаю, лікарський засіб за цим винаходом є імунотерапевтичним засобом, таким як вакцина. Вона може вводиться безпосередньо пацієнту, в уражений орган або системно в/ш, в/м, п/ш, в/ч і в/в, або вноситься *ex vivo* у клітини, отримані від пацієнта, чи у клітинну лінію людини, котрі згодом вводяться пацієнту, або використовуватись *in vitro* для селекції субпопуляції з імунних клітин, які отримані від пацієнта і які потім знов вводяться йому. Якщо нуклеїнова кислота вводиться у клітини *in vitro*, тоді може бути корисним, щоби клітини були трансфектованими, щоби спільно експресувати імуностимулюючі цитокіни, наприклад, інтерлейкін-2. Пептид може бути, по суті, чистим, або поєднаним з імуностимулюючим ад'ювантом (див. нижче), чи використовуватись в комбінації з імуностимулюючими цитокінами, або вводиться з належною системою доставки, наприклад, ліпосомами. Пептиди також можуть бути кон'юговані з належним носієм, таким як гемоціанін фісурели (KLH) або маннан (див. патентну заявку WO 95/18145 та роботу (Longenecker et al., 1993)). Пептид також може бути міченим або бути злитим білком чи гібридною молекулою. Очікується, що пептиди, послідовності яких наведені у цьому винаході, стимулюють CD4 або CD8 Т-клітини. Проте стимуляція CD8Т-клітин є більш ефективною за умови сприяння з боку CD4 Т-хелперних клітин. Таким чином, для епітопів МНС І класу, які стимулюють CD8 Т-клітини, партнер по злиттю або сегменти гібридної молекули принагідно постачають епітопи, які стимулюють CD4-позитивні Т-клітини. CD4- і CD8-стимулюючі епітопи добре відомі фахівцям в цій галузі і включають епітопи, ідентифіковані в цьому винаході.

Згідно з одним аспектом винаходу, вакцина містить принаймні один пептид, який має амінокислотну послідовність від SEQ ID No. 1 до SEQ ID No. 67, і принаймні один додатковий пептид, переважно, від двох до 50, більш переважно, від двох до 25, ще більш переважно, від двох до 20, і найбільш переважно, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять, п'ятнадцять, шістнадцять, сімнадцять або вісімнадцять пептидів. Пептид(и) може (можуть) бути виділений (виділені) з одного або більшої кількості специфічних ТАА і може (можуть) зв'язатися з молекулами МНС І класу.

Згідно з ще одним аспектом винаходу пропонується нуклеїнова кислота (наприклад, полінуклеотид), що кодує пептид чи його варіант за винаходом. Полінуклеотид може бути, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, СНК, РНК чи їх комбінацією, як одноланцюговою, так і (або) дволанцюговою, або природними чи стабілізованими формами полінуклеотидів, такими як, наприклад, полінуклеотиди з фосфоротіоатним скелетом; він може містити або не містити інтрони, за умови, що він кодує пептид. Звичайно, що тільки пептиди, що містять природно існуючі амінокислотні залишки, з'єднані природно існуючими пептидними зв'язками, можуть бути кодовані полінуклеотидом. Згідно з ще одним аспектом цього винаходу, пропонується вектор експресії, здатний експресувати поліпептид відповідно до винаходу.

Було розроблено багато способів зв'язування полінуклеотидів, особливо ДНК, з векторами, наприклад, за допомогою комплементарних липких кінців. Наприклад, можуть бути додані комплементарні гомополімерні хвости до сегменту ДНК, щоб бути вставленими у вектор ДНК. Цей вектор і сегмент ДНК потім з'єднують водневим зв'язком між комплементарними гомополімерними хвостами з утворенням молекул рекомбінантної ДНК.

Синтетичні лінкери, що містять один або більше сайтів рестрикції, забезпечують альтернативний спосіб об'єднання фрагментів ДНК у вектори. Синтетичні лінкери, що містять різноманітні сайти впізнавання рестрикційних ендонуклеаз, комерційно доступні у декількох джерелах, включаючи компанію International Biotechnologies Inc., Нью Хейвен, Коннектикут, США.

У бажаному методі модифікації ДНК, що кодує поліпептид за винаходом, використовується полімеразна ланцюгова реакція, як це розкрито у роботі Saiki RK і співавт. (Saiki et al., 1988). Цей метод може використовуватися для введення цієї ДНК у відповідний вектор, наприклад, шляхом створення відповідних сайтів рестрикції, або його можна застосовувати для модифікації ДНК у інший прийнятний спосіб, відомий фахівцям у цій галузі. Якщо використовуються вірусні вектори, переважними є вектори на основі поксвірусу або аденовірусу.

Ця ДНК (або, у випадку ретровірусного вектора, РНК) може потім експресуватися у відповідному організмі-хазяїні, утворюючи поліпептид, що містить пептид або чи його варіант за винаходом. Таким чином, ДНК, яка кодує пептид чи його варіант за винаходом, може використовуватися відповідно до відомих методик, належним чином модифікованих виходячи з ідей, розкритих у цьому описі, для конструювання вектора експресії, який після цього використовується для трансформації відповідних клітин-хазяїв таким чином, щоб вони набули здатність експресувати і виробляти пептиди за винаходом. Ці методики включають такі, що розкриті, наприклад, у 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 і 4 810 648.

Ця ДНК (або, у випадку ретровірусного вектора, РНК), яка кодує поліпептид, що є предметом цього винаходу, може бути з'єднана з широким спектром інших послідовностей ДНК для введення у відповідну клітину-хазяїна. Ця супутня ДНК буде залежати від природи хазяїна, способу представлення ДНК хазяїну, і від того, необхідне утримання в епісомальній чи інтегрованій формі.

Зазвичай ДНК вставляється у вектор експресії, такий як плазміда, у належній орієнтації і коректній рамці зчитування для експресії. Якщо необхідно, ДНК може бути зв'язаною з відповідними нуклеотидними послідовностями, що забезпечують координацію транскрипції і трансляції, що розпізнаються бажаним хазяїном, хоча такі контрольні елементи зазвичай містяться у векторі експресії. Вектор згодом вводиться хазяїну із використанням стандартних методик. Загалом, не всі хазяї трансформуються вектором. Отже, необхідно виділити трансформовані клітини-хазяї. Одна з методик виділення включає введення до складу вектора експресії такої послідовності ДНК із будь-якими необхідними контрольними елементами, яка кодує вибрану ознаку у трансформованій клітині, таку як резистентність до антибіотиків.

Як альтернатива, ген для такої вибраної ознаки може бути вбудованим в інший вектор, який використовується для спільної трансформації бажаної клітини-хазяїна.

Клітини-хазяї, які були трансформовані рекомбінантною РНК за винаходом, потім культивують протягом достатнього періоду часу у відповідних умовах, які відомі фахівцям в цій галузі з точки зору ідей, розкритих тут, з метою дати можливість експресувати поліпептид, який потім може бути виділений.

Фахівцям відомі багато експресійних систем, включаючи бактерії (наприклад, *E. coli* і *Bacillus subtilis*), дріжджі (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), міцеліальні гриби (наприклад, *Aspergillus* спес.), клітини рослин, тварин і комах. Переважно, система може бути клітинами ссавців, таких як клітини CHO, які комерційно доступні від Американської колекції типових культур ATCC.

Типова векторна плазмідна клітин ссавців для конститутивної експресії включає вірус CMV або промотор SV40 з відповідним поліаденільним хвостом poly(A)-tail і маркером резистентності, таким є неоміцин. Одним із прикладів є pSVL, доступний від компанії Pharmacia, Піскатеуей, Нью-Джерсі, США. Прикладом вектора індукційної експресії у ссавців є pMSG, також доступний від компанії Pharmacia. Корисними є плазмідні вектори дріжджів pRS403-406 і pRS413-416, які доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Каліфорнія 92037, США. Плазмідні pRS403, pRS404, pRS405 і pRS406 є дріжджовими інтегруючими плазмідами (YIp) і включають дріжджові селективні маркери HIS3, TRP1, LEU2 і URA3. Плазмідні pRS413-416 є дріжджовими плазмідами з центромерами (Ycp). Вектори на базі промотору CMV (наприклад, від компанії Sigma-Aldrich) забезпечують тимчасову або стабільну експресію, цитоплазматичну експресію або секрецію і N-термінальне або C-термінальне мічення для різних комбінацій FLAG, 3xFLAG, c-мус або MAT. Ці злиті білки можна використовувати для виявлення, очищення і аналізу рекомбінантного білка. Злиття з використанням двох міток забезпечує гнучкість під час виявлення.

Сильна регуляторна область промотора цитомегаловірусу (CMV) людини підвищує рівні конститутивної експресії білка у клітинах лінії COS до таких високих значень, як 1 мг/л. У разі не таких активних ліній клітин рівні білка зазвичай становлять ~0,1 мг/л. Присутність ділянки початку реплікації у фрагменті SV40 приводить до високих рівнів реплікації ДНК у пермісивних клітинах COS. Вектори CMV, наприклад, можуть містити pMB1 (похідне pBR322) ділянку початку реплікації у клітинах бактерій, ген бета-лактамази для вибору резистентності бактерій до ампіциліну, poly(A) гормону росту людини і ділянку початку реплікації f1. Вектори, що містять лідерну послідовність препротрипсину (PPT), можуть направляти секрецію злитих білків FLAG в культуральному середовищі на очищення антитіл проти FLAG, смол і планшетів. Інші вектори і експресійні системи також добре відомі у цій галузі для використання у багатьох клітинах-хазяїнах.

В іншому втіленні два або більше пептидів або варіантів пептидів за винаходом кодуються і, отже, експресуються послідовно (подібно до конструкцій "вузли на мотузці"). При цьому пептиди або варіанти пептидів можуть бути зв'язані або злиті одне з одним фрагментами лінкерних амінокислотних послідовностей, такими, наприклад, як LLLLLL, або можуть зв'язатися без будь-яких додаткових пептидів між ними. Ці конструкції можуть також застосовуватися для терапії раку і можуть індукувати імунну відповідь за участі як молекул MHC I класу, так і MHC II класу.

Цей винахід також стосується клітини-хазяїна, трансформованої полінуклеотидною векторною конструкцією за винаходом. Клітина-хазяїн може бути або прокаріотичною, або еукаріотичною. Бактеріальні клітини можуть бути переважно прокаріотичними клітинами-хазяїнами у деяких обставинах, а зазвичай це штам *E. coli*, такий як, наприклад, штам DH5 *E. coli*, доступний від компанії Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Меріленд, США, і RR1, доступний від Американської колекції типових культур ATCC, Роквіл, Меріленд, США (Номер ATCC 31343). Переважні еукаріотичні клітини-хазяї включають клітини дріжджів, комах і ссавців, переважно клітини хребетних, такі як лінії фібробластних клітин і клітин товстої кишки від мишей, пацюків, мавп або людини. Дріжджові клітини-хазяї включають YPH499, YPH500 і YPH501, які зазвичай доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, 92037, Каліфорнія, США. Переважні клітини-хазяї ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), доступні як штам ATCC CCL61, клітини ембріонів швейцарської миші штаму NIH/3T3, доступні з колекції ATCC CRL 1658, клітини COS-1 з нирок мавп, доступні з колекції ATCC CRL 1650 і клітини 293 нирок ембріонів людини. Переважними клітинами комах є клітини Sf9, що можуть бути трансфектовані векторами експресії бацилловірусу. Огляд публікацій щодо вибору відповідних клітин-хазяїв для експресії можна знайти, наприклад, у підручнику: Paulina Balbás and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols, " Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, і інших літературних джерелах, відомих фахівцю у цій галузі.

Трансформація відповідних клітин-хазяїв за допомогою ДНК-конструкції за цим винаходом здійснюється добре відомими методами, вибір яких, як правило, залежить від типу вектора, що використовується. Щодо трансформації прокаріотичних клітин-хазяїв див., наприклад, Cohen і співавт. (Cohen et al., 1972) і (Green and Sambrook, 2012). Трансформація дріжджових клітин описана в роботі Sherman і співавт. (Sherman et al., 1986). Метод Beggs (Beggs, 1978) також є

корисним. Щодо клітин хребетних, реагенти, придатні для трансфекції таких клітин, наприклад, фосфат кальцію і ДЕАЕ-декстран або ліпосомні препарати, доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, або Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Меріленд 20877, США. Електропорація також придатна для трансформації і (або) трансфекції клітин і відома в цій галузі як метод трансформації клітин дріжджів, клітин бактерій, клітин комах і клітин хребетних.

Успішно трансформовані клітини, наприклад, клітини, що містять ДНК-конструкцію за цим винаходом, можуть бути ідентифіковані добре відомими методами, такими як ПЛР. Альтернативно, присутність білка у супернатанті можна виявити за допомогою антитіл.

Зрозуміло, що певні клітини-хазяї за винаходом здатні синтезувати пептиди за винаходом, наприклад, клітини бактерій, дріжджів і комах. Проте в певних терапевтичних методах можуть використовуватися інші клітини-хазяї. Наприклад, антиген-презентуючі клітини, такі як дендритні клітини, можуть принагідно використовуватися, щоби експресувати пептиди за винаходом, які можуть бути навантажені на відповідні молекули МНС. Отже, цей винахід також стосується клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту або вектор експресії за цим винаходом.

У переважному втіленні клітина-хазяїн є антиген-презентуючою клітиною, зокрема дендритною клітиною або антиген-презентуючою клітиною. Управління з контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами (FDA) США 29 квітня 2010 року схвалило застосування АПК, навантажених рекомбінантним злитим білком, що містить простатичну кислоту фосфатазу (PAP), для лікування метастатичного HRPС (гормон-рефрактерного раку передміхурової залози), що протікає безсимптомно або з мінімально вираженими симптомами (сіпулейцел-Т) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

Згідно з ще одним аспектом винаходу пропонується спосіб отримання пептиду або його варіанту, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна і виділення пептиду з клітини-хазяїна або її культурального середовища.

В іншому втіленні пептид, нуклеїнова кислота або вектор експресії за винаходом застосовуються у медицині. Наприклад, пептид або його варіант може бути приготований для внутрішньовенного (в/в) введення, підшкірного (п/ш) введення, внутрішньошкірного (в/ш) введення, внутрішньочеревного (в/ч) введення, внутрішньом'язового (в/м) введення. Переважні способи введення пептиду – це п/ш, в/ш, в/ч, в/м і в/в. Переважними способами введення ДНК є в/ш, в/м, п/ш, в /ч і в/в. Можуть вводитись дози від 50 мкг до 1,5 мг, переважно від 125 мкг до 500 мкг пептиду або ДНК залежно від відповідного пептиду чи ДНК. Дози в цьому діапазоні успішно використовувались в попередніх дослідженнях (Walter et al., 2012).

Полінуклеотид, що застосовується для активної вакцинації, може бути по суті чистим або включеним в належний вектор чи в систему доставки. Нуклеїнова кислота може бути, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їхньою комбінацією. Методи конструювання і введення такої нуклеїнової кислоти добре відомі фахівцям в цій галузі. Їх огляд наведений, наприклад, у роботі Teufel і співавт. (Teufel et al., 2005). Полінуклеотидні вакцини легко приготувати, але механізм дії цих векторів у виникненні імунної відповіді повністю не з'ясований. Прийнятні векторні системи і системи доставки включають вірусну ДНК і (або) РНК, такі як системи на базі аденовірусу, вірусу коров'ячої віспи, ретровірусу, вірусу герпесу, аденоасоційованого вірусу або гібридів, що містять елементи більш ніж одного вірусу. Невірусні системи доставки включають катіонні ліпіди та катіонні полімери, добре відомі в галузі засобів доставки ДНК. Також може використовуватись фізична доставка, наприклад, за допомогою "генної гармати". Пептид або пептиди, що кодуються нуклеїновою кислотою, може (можуть) бути злитим білком, наприклад, з епітопом, що стимулює Т-клітини щодо відповідних протилежних CDR, як відзначається вище.

Лікарський засіб за винаходом може також включати один або більше ад'ювантів. Ад'юванти є речовинами, які у неспецифічний спосіб підвищують або підсилюють імунну відповідь (наприклад, імунну відповідь на антиген, яку опосередковують CD8-позитивні Т-клітини і Т-хелпери (ТН), і, отже, можуть вважатися корисними для використання у лікарському засобі за винаходом. Відповідні ад'юванти включають, але не обмежуються ними, 1018 ISS, солі алюмінію, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, флагелін чи ліганди TLR5, які походять з флагеліну, ліганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, іміквімод (ALDARA®), резиквімод, ImuFact IMP321, інтерлейкіни, такі як ІЛ-2, ІЛ-13, ІЛ-21, інтерферон-альфа чи -бета, або їхні пегільовані похідні, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, імуностимулюючі комплекси ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфориловий ліпід А, монтанід IMS 1312, монтанід ISA 206, монтанід ISA 50V, монтанід ISA-51, емульсії "вода у маслі" та "масло у воді", ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторну систему PepTel®, мікрочастинки на основі полілактиду когліколіду [PLG] та декстрану, талактоферин, SRL172, віросоми та інші вірусоподібні частинки, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон QS21 Aquila, який виділяється з сапоніну, мікобактеріальні екстракти та синтетичні імітатори стінок

бактеріальних клітин, а також інші патентовані ад'юванти, наприклад, Ribl's Detox, Quil чи Superfos. Переважними є такі ад'юванти, як ад'ювант Фрейнда або ГМ-КСФ. Декілька імунологічних ад'ювантів (наприклад, MF59), специфічних до дендритних клітин, та способи їх приготування були описані раніше (Allison and Krummel, 1995). Також можуть застосовуватися цитокіни. Окремі цитокіни були прямо співвіднесені з впливом на міграцію дендритних клітин до лімфоїдних тканин (наприклад, TNF-), прискорюючи дозрівання дендритних клітин до ефективних антиген-презентуючих клітин для Т-лімфоцитів (наприклад, ГМ-КСФ, ІЛ-1 та ІЛ-4) (Патент США 5 849 589, конкретно включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті) та діючи як імуноад'юванти (наприклад, ІЛ-12, ІЛ-15, ІЛ-23, ІЛ-7, ІФН-альфа, ІФН-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Також доповідалося про те, що імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди посилюють ефект ад'ювантів у складі вакцин. Якщо не вдаватися у подробиці теорії, CpG-олігонуклеотиди діють шляхом активації природної (не здобутої) імунної системи за допомогою Toll-подібних рецепторів (TLR), переважно TLR9. Активація TLR9, ініційована CpG, посилює антиген-специфічні гуморальні та клітинні реакції на широкий спектр антигенів, включаючи пептидні чи білкові антигени, живі або знищені віруси, вакцини на основі дендритних клітин, аутологічні клітинні вакцини та полісахаридні кон'югати як в профілактичних, так і в терапевтичних вакцинах. Важливішим є те, що посилюється визрівання та диференціація дендритних клітин, що в результаті збільшує активацію TH1-клітин та інтенсивну генерацію цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) навіть за відсутності підтримки з боку CD4 Т-клітин. Активація TH1, індукована стимуляцією TLR9, зберігається навіть у присутності вакцинних ад'ювантів, таких як галун чи неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), котрі зазвичай сприяють активації TH2. CpG-олігонуклеотиди демонструють навіть більшу ад'ювантну активність, коли переводяться в лікарську форму або вводяться разом з іншими ад'ювантами чи в таких формах, як мікрочастинки, наночастинки, ліпідні емульсії або подібні композиції, особливо необхідні для індукування сильної відповіді, коли антиген відносно слабкий. Вони також прискорюють імунну відповідь та дозволяють зменшити дози антигену приблизно на два порядки в порівнянні з відповідями антитіл на вакцину в повній дозі без CpG, як спостерігалось в деяких експериментах (Krieg, 2006). У патенті США 6 406 705 В1 описується комбіноване застосування CpG-олігонуклеотидів, ад'ювантів, що не містять нуклеїнові кислоти, та антигену для індукування антиген-специфічної імунної відповіді. CpG TLR9-антагоністом є dSLIM (імуномодулятор із структурою типу дволанцюжкове стебло-петля) компанії Mologen (Берлін, Німеччина), котрий є переважним компонентом фармацевтичної композиції за цим винаходом. Також можуть використовуватися інші TLR-зв'язувальні молекули, наприклад, TLR 7, TLR 8 і (або) TLR 9, що зв'язуються з РНК.

Інші приклади прийнятних ад'ювантів включають, без обмежень, хімічно модифіковані CpG (наприклад, CpR, Idera), аналоги ds-РНК, такі як полі(I:C) та їхні похідні (наприклад, AmpliGen®, Hiltonol®, полі-(ICLC), полі(IC-R), полі(I:C12U), бактеріальні ДНК або РНК, відмінні від CpG, а також невеликі імунологічно активні молекули та антитіла, такі як циклофосфамід, сунітиніб, бевацизумаб, целебрекс, NCX-4016, сілденафіл, тадалафіл, варденафіл, сорафеніб, темозоломід, темзиролімум, XL-999, CP-547632, пазопаніб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4, інші антитіла, націлені на ключові структури імунної системи (наприклад, анти-CD40-, анти-TGFβ-альфа-рецептори) та SC58175, які можуть діяти терапевтично і (або) як ад'юванти. Кількості та концентрації ад'ювантів та добавок, прийнятних в контексті цього винаходу, можуть бути легко визначені досвідченим фахівцем без зайвого експериментування.

Переважаючими ад'ювантами є анти-CD40-антитіла, іміквімод, резиквімод, ГМ-КСФ, циклофосфамід, сунітиніб, бевацизумаб, інтерферон-альфа, CpG олігонуклеотиди та їх похідні, полі-(I:C) та її похідні, РНК, сілденафіл і композиції з твердих мікрочастинок з PLG або віросоми.

В переважному втіленні фармацевтичної композиції за винаходом ад'ювант вибирається з групи, що складається з колонієстимулюючих факторів, таких як Фактор стимулювання утворення колоній гранулоцитів-макрофагів (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамід, іміквімод, резиквімод та інтерферон-альфа.

В переважному втіленні фармацевтичної композиції за винаходом ад'ювант вибирається з групи, що складається з колонієстимулюючих факторів, таких як Фактор стимулювання утворення колоній гранулоцитів-макрофагів (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамід, іміквімод і резиквімод. У переважному втіленні фармацевтичної композиції за винаходом ад'ювантом є циклофосфамід, іміквімод чи резиквімод. Навіть більш переважними ад'ювантами є монтанід IMS 1312, монтанід ISA 206, монтанід ISA 50V, монтанід ISA-51, полі-ICLC (Hiltonol®) і моноклональні анти-CD40-антитіла або їх комбінація.

Ця композиція може застосовуватися для парентерального введення, наприклад, підшкірного, внутрішньожірного, внутрішньом'язового або для перорального застосування Для

цього пептиди і необов'язково інші молекули розчиняють або суспендують у фармацевтично прийнятному, переважно водному носії. Крім того, композиція може містити допоміжні речовини, такі як буфери, зв'язувальні речовини, баластні речовини, розріджувачі, ароматизатори, антифрикційні речовини тощо. Пептиди можна також ввести разом із імуностимуляторами, такими як цитокіни. Великий перелік допоміжних речовин, які можна використовувати у такій композиції, можна знайти, наприклад, у посібнику A. Kibbe, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Kibbe, 2000). Ця композиція може застосовуватися для попередження, профілактики і (або) лікування аденоматозних або ракових захворювань. Приклади фармацевтичних композицій наведені, наприклад, у EP2113253.

Важливо розуміти, що імунна відповідь, ініційована вакциною за винаходом, спрямована проти ракових клітин на різних стадіях клітинного циклу і на різних стадіях розвитку пухлини. Більш того, атака здійснюється на різні асоційовані з раковими пухлинами сигнальні шляхи. Це є перевагою над вакцинами, які направлені тільки на одну чи малу кількість мішеней, що може привести до легкої адаптації пухлини до атаки (уникання пухлиною). Більш того, не усі індивідуальні пухлини експресують одну й ту саму картину антигенів. Таким чином, комбінація декількох пухлино-асоційованих пептидів гарантує, що кожна окрема пухлина несе принаймні деякі з мішеней. Композиція була створена виходячи з того, що, як очікується, кожна пухлина експресує декілька антигенів і охоплює декілька незалежних сигнальних шляхів, необхідних для росту і розвитку пухлини. Таки чином, вакцину може легко використовувати у "готовому для застосування" вигляді для більшої популяції пацієнтів. Це означає, що попередній відбір пацієнтів, що потребують лікування цією вакциною, можна обмежити типуванням за HLA, не потребує будь-якого додаткового дослідження біомаркерів експресії антигенів, але все ж забезпечується одночасна атака декількох мішеней у вигляді індукованої імунної відповіді, що є важливим для ефективності (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Термін "каркас" в контексті цього винаходу означає молекулу, яка специфічно зв'язується з (наприклад, антигенною) детермінантою. В одному з втілень каркас здатний направляти об'єкт, до якого він приєднаний (наприклад, (другий) антиген-зв'язувальний елемент) до сайту-мішені, наприклад, до клітини конкретного виду пухлини або до стромы пухлини, що несе антигенну детермінанту (наприклад, комплекс пептид-МНС відповідно до цього підходу). В іншому втіленні каркас здатний активувати сигнальний шлях через його антиген-мішень, наприклад, антиген комплексу Т-клітинного рецептора. Каркаси включають, але не обмежуються ними, антитіла і їх фрагменти, антиген-зв'язувальні домени антитіл, що містять варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла і варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, зв'язувальні білки, що містять принаймні один модуль анкіринового повтору і однодоменні антиген-зв'язувальні (SDAB) молекули, аптамери, (розчинні) ТКР і (модифіковані) клітини, такі як алогенні або аутологічні Т-клітини. Щоб оцінити, чи буде молекула каркасом, що зв'язується з мішенню, можна провести аналіз зв'язування.

"Специфічне" зв'язування означає, що каркас зв'язує досліджуваний комплекс пептид-МНС краще ніж інші природно існуючі комплекси пептид-МНС до такої міри, що каркас, споряджений активною молекулою, яка здатна знищувати клітину, що несе конкретну мішень, не здатний знищувати іншу клітину без конкретної мішені, але таку, що презентує інший(-і) комплекс(-и) пептид-МНС. Зв'язування з іншими комплексами пептид-МНС не має значення, якщо пептид, що бере участь у перехресній реакції, не зустрічається в природі, тобто не отриманий із пептидому HLA. Тести для оцінки знищення клітин-мішеней добре відомі фахівцям в цій галузі. Їх потрібно виконувати з використанням клітин-мішеней (первинних клітинних культур або клітинних ліній) із незміненою презентацією пептидів молекулами МНС, або клітин, навантажених пептидами, у такий спосіб, щоб були досягнуті природні рівні комплексів пептид-МНС.

Кожний каркас містить мітку, яка забезпечує можливість виявлення зв'язаного каркаса шляхом визначення присутності або відсутності сигналу, який генерує мітка. Наприклад, каркас може бути міченим флуоресцентним барвником або іншою застосовною маркерною молекулою клітини. Такі маркерні молекули добре відомі в цій галузі. Наприклад, флуоресцентне мічення, наприклад, флуоресцентним барвником, може забезпечити візуалізацію зв'язаного аптамеру за допомогою флуоресценції або лазерної сканувальної мікроскопії або проточної цитометрії.

Кожний каркас може бути кон'югованим із другою активною молекулою, такою як, наприклад, IL-21, антитіло проти CD3 і антитіло проти CD28.

Додаткову інформацію про поліпептидні каркаси див., наприклад, у розділі "Передумова створення винаходу" у заявці WO 2014/071978A1 і у посиланнях, наведених в ній.

Цей винахід також стосується аптамерів. Аптамери (див., наприклад, WO 2014/191359 і посилання, наведені в цій роботі) є молекулами коротких одноланцюгових нуклеїнових кислот,

які можуть складатися у певні тримірні структури і розпізнавати специфічні структури-мішені. Вони, очевидно, є прийнятними альтернативами для розробки таргетної терапії. Було показано, що аптамери селективно зв'язуються з багатьма складними мішенями з високою афінністю і специфічністю.

Аптамери, що розпізнають розташовані на поверхні молекули, були ідентифіковані у минулому десятиріччі і забезпечують засоби для розробки діагностичних і терапевтичних підходів. Оскільки було показано, що аптамери майже не проявляють жодної токсичності і імуногенності, вони є перспективними кандидатами у речовини для біомедичних застосувань. Справді, аптамери, наприклад, такі, що розпізнають простат-специфічні мембранні антигени, були успішно застосовані для таргетної терапії, і було показано, що вони виявляють ці функції в трансплантатних моделях *in vivo*. Більш того, були ідентифіковані аптамери, які розпізнають конкретні лінії пухлинних клітин.

Можуть бути вибрані аптамери ДНК, що проявляють розпізнавальні властивості широкого спектру по відношенню до різних ракових клітин, особливо до таких, що отримані з солідних пухлин, у той час як непухлинногенні і первинні здорові клітини ними не розпізнаються. Якщо ідентифіковані аптамери розпізнають не тільки підтип конкретної пухлини, але скоріше взаємодіють з рядом пухлин, це надає аптамерам властивість бути застосовними в якості так званих діагностичних і терапевтичних засобів широкого спектру.

Далі, дослідження зв'язувальних властивостей по відношенню до клітин методом проточної цитометрії показало, що аптамери виявляють дуже добру позірну афінність, яка знаходиться у наномольному діапазоні.

Аптамери можуть використовуватися для діагностичних і терапевтичних цілей. Далі, можна показати, що деякі аптамери поглинаються пухлинними клітинами і таким чином можуть використовуватися як молекулярні носії для цілеспрямованої доставки протиракових препаратів, таких як міРНК, у пухлинні клітини.

Аптамери можуть бути вибрані проти складних мішеней, таких як клітини і тканини і комплекси пептидів, що включають, переважно що складаються з послідовності відповідно до будь якої послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 67 за цим винаходом із молекулою МНС з використанням методики SELEX (Систематична еволюція лігандів шляхом експоненційного збагачення).

Пептиди за цим винаходом можуть використовуватися для продукції і розробки антитіл, специфічних до комплексів МНС/пептид. Вони можуть застосовуватися для лікування, націлюючи токсини або радіоактивні речовини на хворі тканини. Іншим використанням цих антитіл може бути націлювання радіонуклідів на хворі тканини з метою формування зображень, таких як позитронна емісійна томографія (ПЕТ). Таке використання може виявляти невеликі метастази або визначати розмір і точну локалізацію хворих тканин.

Таким чином, в ще одному аспекті цей винахід стосується способу отримання рекомбінантного антитіла, яке специфічно зв'язується з головним комплексом гістосумісності (МНС) людини I або II класу, який входить до складу комплексу з антигенами, обмеженими за HLA, причому спосіб включає: імунізацію клітинами ссавців нелюдського походження, отриманих методами генної інженерії, що експресують згаданий головний комплекс гістосумісності (МНС) людини I або II класу із розчинною формою молекули МНС I або II класу, яка входить до складу комплексу зі згаданими антигенами, обмеженими за HLA; виділення молекул іРНК із клітин згаданих ссавців нелюдського походження, що продукують антитіла; отримання бібліотеки фагового дисплея, що містить фаги, які експонують молекули білка, який кодується згаданими молекулами іРНК; і виділення принаймні одного фага із згаданої бібліотеки фагового дисплея, причому згаданий принаймні один фаг експонує згадане антитіло, що специфічно зв'язується із згаданим головним комплексом гістосумісності (МНС) людини I або II класу, який входить до складу комплексу із згаданим антигеном, обмеженим за HLA.

У ще одному аспекті цей винахід стосується антитіла, яке специфічно зв'язується з головним комплексом гістосумісності (МНС) людини I або II класу, який входить до складу комплексу з антигенами, рестрикованими за HLA, в якому антитіло переважно є поліклональним антитілом, моноклональним антитілом, біспецифічним антитілом і (або) химерним антитілом.

Відповідні способи отримання таких антитіл і одноланцюгових головних комплексів гістосумісності (МНС) I класу, а також інших інструментів отримання цих антитіл розкриті в заявках WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 і статтях (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denker et al., 2003), які для цілей цього винаходу всі у прямій формі включені в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

Переважно, антитіло зв'язується з спорідненістю на рівні нижче 20 наномолів, переважно нижче 10 наномолів, у комплекс, який також вважається "специфічним" у контексті цього винаходу.

5 Цей винахід також стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або їхній варіант, який принаймні на 88 % є гомологічним (переважно ідентичним) послідовностям від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або їхнього варіанту, що викликає перехресну реакцію Т-клітин із зазначеним пептидом, де зазначений пептид не є базовим повнорозмірним поліпептидом.

10 Цей винахід також стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або їхній варіант, який принаймні на 88 % є гомологічним (переважно ідентичним) послідовностям від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67, де зазначений пептид або його варіант має загальну довжину між 8 і 100, переважно між 8 і 30 і найбільш переважно між 8 і 14 амінокислот.

15 Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, які здатні зв'язуватись з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згадані пептиди складаються або по суті складаються з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид є (хімічно) модифікованим і (або) включає непептидні зв'язки.

20 Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид є частиною злитого білка, зокрема злитим із N-термінальними амінокислотами HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii), або де пептид є злитим із антитілом (або вбудованим в антитіло), наприклад, із антитілом, що є специфічним до дендритних клітин.

25 Цей винахід також стосується нуклеїнової кислоти, що кодує пептиди за цим винаходом за умови, що пептид не є повністю (цілковито) людським білком.

Цей винахід також стосується нуклеїнової кислоти за цим винаходом, яка являє собою ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їх комбінацію.

Цей винахід також стосується вектора експресії, що здатний експресувати нуклеїнову кислоту за цим винаходом.

30 Цей винахід також стосується пептиду за цим винаходом, нуклеїнової кислоти за цим винаходом або вектора експресії за цим винаходом для застосування в медицині, зокрема в лікуванні раку підшлункової залози.

Цей винахід також стосується клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту за цим винаходом або вектор експресії за цим винаходом.

35 Цей винахід також стосується клітини-хазяїна за цим винаходом, яка є антиген-презентуючою клітиною, і переважно дендритною клітиною.

Цей винахід також стосується способу отримання пептиду за цим винаходом, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна за цим винаходом і виділення пептиду зі згаданого клітини-хазяїна або її культурального середовища.

40 Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, де антиген навантажують на молекули МНС I або II класу, що експресуються на поверхні відповідної антиген-презентуючої клітини шляхом контакту достатньої кількості антигену з антиген-презентуючою клітиною.

45 Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина містить вектор експресії, здатний експресувати згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або згаданий варіант амінокислотної послідовності.

Цей винахід також стосується активованих Т-клітин, отриманих згідно способу за цим винаходом, де згадані Т-клітини селективно розпізнають клітину, яка експресує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за цим винаходом.

50 Цей винахід також стосується способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого абераантно експресують поліпептид, що містить будь-яку амінокислотну послідовність за цим винаходом, причому спосіб включає введення в організм пацієнта ефективною кількістю Т-клітин за цим винаходом.

55 Цей винахід також стосується застосування будь-якого пептиду, що описаний тут, нуклеїнової кислоти за цим винаходом, вектора експресії за цим винаходом, клітини за цим винаходом, або активованого цитотоксичного Т-лімфоцита за цим винаходом, як лікарського засобу або в процесі виробництва лікарського засобу. Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де лікарський засіб виявляє протиракову активність.

60 Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де лікарський засіб являє собою вакцину. Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де лікарський засіб виявляє протиракову активність.

Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де згадані ракові клітини є клітинами раку підшлункової залози або клітинами інших солідних або гематологічних пухлин, таких як рак підшлункової залози, рак головного мозку, рак нирки, рак товстої або прямої кишки, лейкоз.

5 Цей винахід також стосується конкретних маркерних білків і біомаркерів на основі пептидів за цим винаходом, які у цьому документі іменуватимуться як "мішені", які можуть використовуватися в діагностиці і (або) визначенні прогнозу перебігу раку підшлункової залози. Цей винахід також стосується застосування цих нових мішеней для лікування раку.

10 Термін "антитіло" або "антитіла" використовується в тут у широкому сенсі і включає як поліклональні, так і моноклональні антитіла. На додаток до інтактних або "повнорозмірних" молекул імуноглобуліну, до терміну "антитіла" також входять фрагменти (наприклад, фрагменти CDR, Fv, Fab і Fc) або полімери цих молекул імуноглобуліну і гуманізовані версії молекул імуноглобуліну, за умови, що вони виявляють будь-які з бажаних властивостей (наприклад, специфічне зв'язування (полі)пептидного маркера раку підшлункової залози, доставка токсину

15 до клітини раку підшлункової залози, що експресує ген-маркер раку легенів на підвищеному рівні, і (або) інгібування активності поліпептидного маркера раку підшлункової залози) відповідно до цього винаходу.

За найменшої можливості антитіла за винаходом слід закуповувати у комерційних підприємств. Антитіла за винаходом можуть бути отримані з використанням добре відомих методів. Кваліфікований фахівець зрозуміє, що для отримання антитіл за винаходом можуть бути використані як повнорозмірні поліпептидні маркери раку підшлункової залози, так і їх фрагменти. Поліпептид, який буде використовуватися для отримання антитіл за винаходом, може бути повністю чи частково очищеним компонентом природного джерела або може бути отриманий за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

25 Наприклад, кДНК, що кодує пептид за цим винаходом, такий як пептид з послідовністю від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67 або його варіант чи фрагмент, може експресуватися в прокаріотичних клітинах (наприклад, бактерій) або еукаріотичних клітинах (наприклад, клітинах дріжджів, комах або ссавців), після чого рекомбінантний білок можна очистити і використати для отримання препарату моноклональних або поліклональних антитіл, які специфічно зв'язують

30 поліпептидний маркер раку підшлункової залози, що був використаний для отримання антитіл за цим винаходом.

Фахівцю в цій галузі відомо, що отримання двох або більше різних комплектів моноклональних або поліклональних антитіл максимально збільшує ймовірність отримання антитіла, що буде мати специфічність та афінність, необхідні для використання за

35 призначенням (наприклад, для ELISA, імуногістохімічних методів, візуалізації *in vivo*, лікування імунотоксинами). Антитіла досліджують на бажану активність добре відомими методами, відповідно до цілей, у яких мають використовуватися антитіла (наприклад, ELISA, імуногістохімічні методи, імунотерапія тощо; додаткові відомості щодо отримання і перевірки антитіл див., наприклад, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Наприклад, антитіла можуть бути

40 досліджені методами ELISA, Вестерн-блотингу, імуногістохімічним забарвлюванням фіксованих формаліном зрізів ракової тканини або заморожених зрізів тканини. Після попередніх досліджень *in vitro* антитіла, які мають використовуватися для терапевтичних цілей або для діагностики *in vivo*, досліджують з використанням відомих методів клінічного дослідження.

Термін "моноклональне антитіло" в тому виді, в якому він використовується тут, означає

45 антитіло, отримане із по суті гомогенної популяції антитіл, тобто індивідуальні антитіла, що складають популяцію, є ідентичними, за винятком мутантних форм, що спостерігаються в природі, які можуть бути присутніми в незначній кількості. Моноклональні антитіла за цим патентом конкретно включають "химерні" антитіла, у яких частина важкого і (або) легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих із

50 окремого виду, або які належать до окремого класу чи підкласу антитіл, в той час як решта ланцюга (ланцюгів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих із іншого виду або які належать до іншого класу чи підкласу антитіл, а також фрагментів таких антитіл, за умови, що вони виявляють бажану антагоністичну активність (Пат. США 4 816 567, включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті).

55 Моноклональні антитіла за винаходом можуть бути отримані гібридомними технологіями. У гібридомних технологіях мишу або іншу прийнятну тварину-хазяїна, як правило, імунізують імунізуючим агентом для створення лімфоцитів, які продукують або здатні продукувати антитіла, які специфічно зв'язуються з імунізуючим агентом. Альтернативно, лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*.

Моноклональні антитіла можуть також бути створені технологіями рекомбінантних ДНК, такими як описані в патенті США 4 816 567. ДНК, що кодує моноклональні антитіла за винаходом, можна легко виділити і секвенувати з використанням традиційних методик (наприклад, використовуючи олігонуклеотидні зонди, здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіл миші).

Методи *In vitro* також придатні для створення одновалентних антитіл. Розщеплення антитіл з метою отримання їх фрагментів, зокрема, Fab-фрагментів, можна провести з використанням стандартних методик, відомих у галузі. Наприклад, розщеплення можна виконати за допомогою папаїну. Приклади розщеплення за допомогою папаїну описані у заявці WO 94/29348 і в патенті США 4 342 566. При розщепленні антитіл за допомогою папаїну, як правило, утворюються два ідентичних антиген-зв'язувальних фрагменти, які зветься Fab-фрагментами, кожний з одним антиген-зв'язувальним сайтом, і залишковим Fc фрагментом. Обробка пепсином дає фрагмент F(ab')₂ і фрагмент pFc'.

Фрагменти антитіл, чи то з'єднані з іншими послідовностями, чи ні, можуть також включати вставки, делеції, заміни або інші вибрані модифікації окремих частин або амінокислотних залишків за умови, що активність фрагмента не є значно зміненою або пошкодженою у порівнянні з немодифікованим антитілом або фрагментом антитіла. Ці модифікації можуть надати деякі додаткові властивості, такі як видалити/додати амінокислоти, що здатні до дисульфідного зв'язування, підвищити біологічну довговічність, змінити секреторні властивості тощо. У будь-якому випадку, фрагмент антитіла має виявляти біологічну активність, таку як зв'язувальна активність, регулювання зв'язування у зв'язувальному домені тощо. Функціональні або активні центри антитіла можуть бути ідентифіковані шляхом мутагенезу конкретної ділянки білка, який супроводжується експресією і перевіркою експресованого поліпептиду. Такі методи є цілком очевидними для фахівця у цій галузі і можуть включати сайт-специфічний мутагенез нуклеїнової кислоти, що кодує фрагмент антитіла.

Антитіла за винаходом можуть додатково включати гуманізовані антитіла або людські антитіла. Гуманізованими формами антитіл нелюдського походження (наприклад, мишачі) є химерні імунoglobуліни, ланцюги імунoglobулінів або їх фрагменти (такі як Fv, Fab, Fab' та інші антиген-зв'язувальні послідовності антитіл), які містять мінімальну послідовність, отриману з імунoglobуліну нелюдського походження. Гуманізовані антитіла включають імунoglobуліни людини (антитіло-реципієнт), в яких залишки від комплементарної детермінантної групи (CDR) реципієнта заміщені залишками від CDR нелюдського походження (антитіло-донор), такого як від миші, пацюка або кроля, що має бажану специфічність, афінність і зв'язувальну здатність. У деяких випадках Fv каркасні (FR) залишки імунoglobуліну людини є заміщеними відповідними залишками нелюдського походження. Гуманізовані антитіла можуть включати залишки, які не були виявлені ні в антитілі-реципієнті, ні в імпортованих CDR або послідовностях каркаса. Як правило, гуманізоване антитіло буде містити по суті всі з принаймні одного, а зазвичай двох варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі із ділянок CDR відповідають ділянкам імунoglobуліну нелюдського походження і всі або по суті всі із ділянок FR є ділянками консенсусної послідовності імунoglobуліну людини. Оптимально, якщо гуманізоване антитіло містить також принаймні частину константної ділянки імунoglobуліну (Fc), зазвичай ділянку імунoglobуліну людини.

Методи гуманізації нелюдських антитіл добре відомі фахівцю у цій галузі. Загалом, гуманізоване антитіло має один або більше амінокислотних залишків, введених в нього з джерела, яке є нелюдського походження. Ці амінокислотні залишки нелюдського походження часто називають "імпортними" залишками, які зазвичай беруть із "імпортного" варіабельного домену. Гуманізацію можна по суті провести шляхом заміщення CDR або послідовностей CDR гризунів відповідними послідовностями людського антитіла. Відповідно, такі "гуманізовані" антитіла є химерними антитілами (патент США 4 816 567), в яких суттєво менша частина ніж інтактний варіабельний домен людини була заміщена відповідною послідовністю біологічних видів, відмінних від людини. На практиці гуманізовані антитіла є зазвичай людськими антитілами, в яких деякі залишки CDR і, можливо, залишки FR є заміщеними залишками з аналогічних сайтів антитіл гризунів.

Можуть використовуватися трансгенні тварини (наприклад, миші), які після імунізації набувають здатність продукувати повний спектр людських антитіл в умовах відсутності виробки ендогенного імунoglobуліну. Наприклад, було описано, що гомозиготна делеція гена, що кодує ділянку з'єднання важких ланцюгів антитіла, у химерних клітин і лінії клітин зародків мутантних мишей приводить до повного інгібування виробки ендогенних антитіл. Перенесення генної матриці імунoglobуліну клітин зародків людини у лінію клітин зародків мутантних мишей

приводить до виробки людських антитіл після антигенної стимуляції. Людські антитіла можуть також бути виділені методом фагового дисплея з комбінаторної бібліотеки.

Антитіла за винаходом переважно вводять суб'єкту у фармацевтично прийнятному носіїві. Як правило, для надання фармацевтичній композиції ізотонічності використовують відповідну кількість фармацевтично прийнятної солі. Приклади фармацевтично прийнятного носія включають фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин глюкози. рН розчину переважно має становити приблизно від 5 до 8, і більш переважно приблизно від 7 до 7,5. Додатково пропонуються носії, що включають препарати з тривалим вивільненням, такі як напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, які містять антитіла, причому ці матриці мають вигляд сформованих предметів, наприклад, плівок, ліпосом або мікрочастинок. Фахівцю в цій галузі зрозуміло, що певні носії можуть бути більш переважними, залежно від, наприклад, способу введення і концентрації антитіла, що вводиться.

Антитіла можна вводити суб'єкту, пацієнту або в клітину шляхом ін'єкції (наприклад, внутрішньовенної, внутрішньочеревної, підшкірної, внутрішньом'язової) або іншими методами, такими як інфузія, яка гарантує їх доставку у кровотік у ефективній формі. Антитіла можуть також бути введені внутрішньопухлинним або перитуморальним шляхом з метою отримати місцевий, а також системний терапевтичний ефект. Кращими є місцеве або внутрішньовенне введення.

Ефективні дози і режими дозування для введення антитіл можна визначити емпіричним шляхом, такі визначення знайомі фахівцю в цій галузі. Фахівцю в цій галузі зрозуміло, що дози антитіл, які необхідно вводити, залежать, наприклад, від суб'єкта, який отримує антитіла, шляху введення, конкретного типу використовуваних антитіл та інших лікарських препаратів, які вводяться. Типова щоденна доза при застосуванні антитіл як монотерапії може становити від приблизно 1 мкг/кг до 100 мкг/кг маси тіла або більше на добу, залежно від вищезгаданих факторів. Після введення антитіл, переважно з метою лікування раку підшлункової залози, ефективність терапевтичної дії антитіл можна оцінити різними способами, відомими фахівцю в цій галузі. Наприклад, розмір, кількість і (або) розповсюдження раку в організмі суб'єкта, що отримує лікування, можна контролювати за допомогою стандартних методик візуалізації пухлин. Введене з терапевтичними цілями антитіло, яке затримує ріст пухлини, приводить до скорочення пухлини і (або) запобігає розвитку нових пухлин у порівнянні з перебігом захворювання, який би спостерігався за відсутності введення антитіла, є ефективним антитілом для лікування гліобластоми.

У ще одному аспекті цей винахід стосується способу отримання розчинного Т-клітинного рецептора (pTKR), що розпізнає конкретний комплекс пептиду і МНС. Такі розчинні Т-клітинні рецептори можуть бути отримані зі специфічних клонів Т-клітин, і їх спорідненість можна підвищити мутагенезом, націленим на комплементарні детермінантні групи. З метою вибору Т-клітинних рецепторів може використовуватися метод фагового дисплея (Заявка США 20100113300, (Liddy et al., 2012)). З метою стабілізації Т-клітинних рецепторів у процесі фагового дисплея і у разі застосування як лікарського препарату альфа- і бета-ланцюги можуть буди зв'язані, наприклад ненативними дисульфідними зв'язками або іншими ковалентними зв'язками (одноланцюговий Т-клітинний рецептор) або доменами димеризації (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Т-клітинний рецептор може бути зв'язаний з токсинами, лікарськими препаратами, цитокінами (див., наприклад, заявку США 2013/0115191), доменами, що залучають ефекторні клітини, такі як домени антитіл проти CD3 тощо, щоб виконувати конкретні функції на клітинах-мішенях. Більш того, він може експресуватися у Т-клітинах, що використовуються для адоптивного переносу. Додаткову інформацію можна знайти у заявках WO 2004/033685A1 і WO 2004/074322A1. Комбінація pTKR описана у заявці WO 2012/056407A1. Інші способи отримання розкриті у заявці WO 2013/057586A1.

Крім того, пептиди і (або) ТКР, або антитіла, або інші зв'язувальні молекули за цим винаходом можуть використовуватися для підтвердження діагнозу "рак", поставленому патоморфологом на основі дослідження біоптату.

Ці антитіла або ТКР можуть використовуватися також для діагностики *in vivo*. Зазвичай антитіла мітять радіонуклідами (такими як ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P або ^{35}S), щоб пухлину можна було локалізувати, використовуючи імуносцинтиграфію. В одному з втілень антитіла або їх фрагменти зв'язуються з зовнішньоклітинними доменами двох або більше таких мішеней білка, вибраного з групи, що складається з вищезгаданих білків, із константою зв'язування (K_d) меншою ніж $1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Антитіла для діагностичного застосування можна мітити зондами, що підходять для виявлення різними методами візуалізації. Методи виявлення зондів включають, але не обмежуються ними, флуоресценцію, світлову, конфокальну і електронну мікроскопію, магнітно-

резонансну візуалізацію і спектроскопію, флуороскопію, комп'ютерну томографію та позитронну емісійну томографію. Відповідні зонди включають, але не обмежуються ними, флуоресцеїн, родамін, еозин та інші флуорофори, радіоізотопи, золото, гадоліній та інші лантаноїди, парамагнітне залізо, фтор-18 та інші радіонукліди, що випромінюють позитрони. Крім цього, зонди можуть бути бі- або багатофункціональними і виявлятися більш ніж одним із зазначених методів. Ці антитіла можуть бути безпосередньо або опосередковано мічені вищезгаданими зондами. Прикріплення зондів до антитіл включає ковалентне зв'язування зонда, включення зонда в антитіло і ковалентне прикріплення хелатуючої сполуки для зв'язування зонда, серед інших методів, добре відомих фахівцю у цій галузі. У разі імуногістохімічних методів зразок хворої тканини може бути свіжим чи замороженим або може бути залитим у парафін і фіксованим за допомогою консерванту, такого як формалін. Фіксовані або залиті зразки зрізів тканин приводять у контакт із міченим первинним антитілом і вторинним антитілом, де антитіло використовується для виявлення експресії цих білків *in situ*.

Згідно з іншим аспектом цього винаходу пропонується спосіб отримання активованих Т-клітин *in vitro*, причому спосіб включає контактування *in vitro* Т-клітин із навантаженими антигеном молекулами МНС, що експресуються на поверхні відповідної антиген-презентуючої клітини протягом періоду часу, достатнього для активації Т-клітини шляхом набуття нею специфічності до антигену, де згаданий антиген є пептидом за винаходом. Переважно з антиген-презентуючою клітиною використовують достатню кількість антигену.

Переважно клітина ссавців не має пептидного транспортера ТАР чи має його знижений рівень або знижену функціональну активність. Відповідні клітини з дефіцитом пептидного транспортера ТАР включають клітини Т2, RMA-S і клітини дрозоділі. ТАР є транспортером, асоційованим із процесингом антигену.

Лінія людських клітин з недостатністю Т2, на які завантажуються пептиди, доступна для придбання у Американській колекції типових культур ATCC за адресою 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США, номер за каталогом CRL 1992; лінія клітин дрозоділі Schneider 2 доступна для придбання в ATCC, номер за каталогом CRL 19863; клітинна лінія миші RMA-S описана у Ljunggren і співавт. (Ljunggren and Karre, 1985).

Переважно, клітина-хазяїн до трансфекції не експресує суттєвої кількості молекул МНС I класу. Також переважно клітина-стимулятор експресує молекулу, яка є важливою для забезпечення додаткового стимулюючого сигналу для Т-клітин, таку як будь-яка з молекул B7.1, B7.2, ICAM-1 і LFA 3. Послідовності нуклеїнових кислот багатьох молекул МНС I класу і коstimуляторних молекул є у вільному доступі в базах даних GenBank і EMBL.

У випадку, коли роль антигенів відіграють епітопи комплексу МНС I класу, Т-клітини є CD8-позитивними Т-клітинами.

Якщо антиген-презентуючи клітину трансфекують для експресії такого епітопу, клітина переважно містить вектор експресії, здатний експресувати пептид, що містить послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 67, або варіант його амінокислотної послідовності.

Ряд інших способів може використовуватися для отримання Т-клітин *in vitro*. Наприклад, для отримання ЦТЛ можуть використовуватися аутологічні лімфоцити, які інфільтрують пухлину. Plebanski і співавт. (Plebanski et al., 1995) використовували аутологічні лімфоцити периферійної крові (PLB) для отримання Т-клітин. Більш того, можливе створення аутологічних Т-клітин шляхом обробки дендритних клітин пептидом або поліпептидом або інфікуванням рекомбінантним вірусом. Для отримання аутологічних Т-клітин можуть також використовуватися В-клітини. Крім того, для отримання аутологічних Т-клітин можуть використовуватися макрофаги, оброблені пептидом або поліпептидом або інфіковані рекомбінантним вірусом. S. Walter і співавт. (Walter et al., 2003) описують примування Т-клітин *in vitro* за допомогою штучних антиген-презентуючих клітин (штучні АПК), що також є прийнятним способом отримання Т-клітин проти вибраного пептиду. В цьому винаході штучні АПК отримували шляхом прикріплення заздалегідь сформованих комплексів МНС-пептид до поверхні полістирольних частинок (мікрогранул) за допомогою системи біотин-стрептавідин. Ця система забезпечує точний контроль щільності МНС на штучних АПК, що дозволяє селективно викликати високо- або низькоавідні специфічні до антигену відповіді Т-клітин з високою ефективністю для зразків крові. Окрім комплексів МНС-пептид, штучні АПК мають нести інші білки з коstimулятивною активністю, такі як антитіла проти CD28, прикріплені до їхньої поверхні. До того ж такі системи на базі штучних АПК часто вимагають додавання відповідних розчинних елементів, наприклад, цитокінів, таких як інтерлейкін-12.

Алогенні клітини також можуть використовуватися для отримання Т-клітин, і відповідний спосіб докладно описаний у заявці WO 97/26328, яка включена в цей документ шляхом посилання. Наприклад, окрім клітин *Drosophila* і клітин Т2, інші клітини можуть

використовуватися для презентації антигенів, такі як клітини СНО, інфіковані бациловірусом клітин комах, бактеріальні, дріжджові клітини та клітини-мішені, інфіковані коров'ячою віспою. Крім того, можуть використовуватись віруси рослин (див., наприклад, роботу Porta і співавт. (Porta et al., 1994), в якій описується розробка мозаїчного вірусу вігні як високопродуктивної системи для презентації чужорідних пептидів.

Активовані Т-лімфоцити, які спрямовані проти пептидів за винаходом, є корисними в терапії. Отже, згідно з ще одним аспектом винаходу пропонуються активовані Т-клітини, які можна отримати за допомогою вищезгаданих способів за винаходом.

Активовані Т-клітини, які отримані вищезгаданим способом, селективно розпізнають клітину, яка аберантно експресує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO 67.

Переважно, Т-клітина розпізнає цю клітину шляхом взаємодії свого Т-клітинного рецептора з комплексом HLA/пептид (наприклад, зв'язуванням). Т-клітини є корисними у способі знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберантно експресують поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за винаходом, за яким пацієнту вводиться ефективна кількість активованих Т-клітин. Ці Т-клітини, що вводяться пацієнту, можуть бути виділені з організму пацієнта і активовані як описано вище (тобто вони є аутологічними Т-клітинами). Як альтернатива, ці Т-клітини одержуються не з організму пацієнта, а від іншої людини. Зрозуміло, що переважно ця людина є здоровою людиною. Під терміном "здорова людина" автори винаходу мають на увазі, що людина має хороший загальний стан здоров'я, переважно має адекватну імунну систему та, ще більш переважно, не страждає від якогось захворювання, на яке її можна легко перевірити і виявити.

In vivo, клітини-мішені для CD8-позитивних Т клітин за цим винаходом можуть бути клітинами пухлини (які іноді експресують МНС II класу) і (або) клітинами стромы, що оточують пухлину (пухлинні клітини) (які іноді також експресують МНС II класу; (Dengjel et al., 2006)).

Т-клітини за цим винаходом можуть використовуватися як активні інгредієнти терапевтичної композиції. Отже, предметом цього винаходу також є спосіб знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберантно експресують поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за винаходом, причому спосіб включає введення пацієнту ефективного кількості Т-клітин згідно визначеному вище.

Під терміном "аберантно експресовані" автори винаходу мають на увазі, що поліпептид є надмірно експресованим у порівнянні з нормальними рівнями експресії або що ген є "мовчазним" у тканині, з якої походить пухлина, але він експресується в пухлині. Під терміном "надмірно експресований" автори винаходу мають на увазі, що поліпептид присутній на рівні, що принаймні у 1,2 рази вищий за рівень у нормальній тканині, переважно принаймні у 2 рази, та більш переважно принаймні у 5 або 10 разів вищий за рівень у нормальній тканині.

Т-клітини можуть бути отримані способами, що відомі в галузі, наприклад, тими, що описані вище.

Протоколи для цього так званого адаптивного перенесення Т-клітин добре відомі в цій галузі. Огляди можна знайти, наприклад, у роботах Gattioni і співавт. і Morgan і співавт. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

У ще одному аспекті цей винахід стосується застосування пептидів, які входять до складу комплексу з МНС, для отримання Т-клітинного рецептора, нуклеїнова кислота якого клонована і введена у клітину-хазяїн, переважно Т-клітину. Ця отримана методами генної інженерії Т-клітина може потім бути перенесена в організм пацієнта для лікування раку.

Будь-яка молекула за винаходом, тобто пептид, нуклеїнова кислота, антитіло, вектор експресії, клітина, активована Т-клітина, Т-клітинний рецептор або нуклеїнова кислота, яка її кодує, є прийнятною для лікування захворювань, для яких є характерним те, що клітини уникають імунної відповіді. Таким чином, будь-яка молекула за цим винаходом може застосовуватися як лікарський засіб або в процесі виробництва лікарського засобу. Згадана молекула може використовуватися сама по собі або у комбінації з іншою молекулою (іншими молекулами) за винаходом або відомою молекулою (відомими молекулами).

Предметом цього винаходу є лікарський засіб, який може застосовуватися при лікуванні раку, зокрема, раку підшлункової залози та інших злоякісних захворювань.

За цим винаходом також пропонується комплект, що включає:

(а) контейнер, який містить фармацевтичну композицію як зазначено вище, у розчині або у ліофілізованій формі;

(б) необов'язково, другий контейнер, що містить розріджувач або розчин для відновлення ліофілізованої композиції, і

(в) необов'язково, інструкції із (і) застосування розчину або (ii) відновлення і (або) застосування ліофілізованої композиції.

Комплект може додатково включати один або більше (iii) буферів, (iv) розріджувачів, (v) фільтрів, (vi) голок або (vii) шприців. Контейнер є переважно пляшкою, флаконом, шприцом або
5 пробіркою; і він може бути контейнером багаторазового застосування. Фармацевтична композиція є переважно ліофілізованою.

Комплекти за винаходом, переважно, включають ліофілізовану композицію за цим винаходом в належному контейнері та інструкції з її відновлення і (або) застосування. Належні
10 контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони (наприклад, двокамерні флакони), шприци (такі як двокамерні шприци) і пробірки. Контейнер може бути виготовленим із багатьох видів матеріалів, таких як скло або пластмаса. Переважно, комплект і (або) контейнер містить(ять) інструкції із застосування контейнера або пов'язані з контейнером, які містять вказівки щодо відновлення і (або) застосування. Наприклад, на етикетці може вказуватися, що ліофілізована лікарська форма має бути відновлена до таких концентрацій пептидів як зазначено вище. На
15 етикетці, крім того, може бути зазначено, що лікарська форма є прийнятною для або призначена для підшкірного введення.

Контейнер із лікарською формою може бути флаконом багаторазового застосування, котрий дозволяє робити повторні введення (наприклад, від 2 до 6 введень) відновленої лікарської форми. Комплект додатково може включати другий контейнер, що містить прийнятний
20 розріджувач (наприклад, розчин бікарбонату натрію).

Після змішування розріджувача та ліофілізованої форми остаточна концентрація пептиду у відновленій формі переважно становить принаймні 0,15 мг/мл/пептиду (=75 мкг) та переважно не більше 3 мг/мл/пептиду (=1500 мкг). Комплект додатково може включати інші матеріали, бажані з комерційної точки зору та з точки зору користувача, включаючи інші буфери,
25 розріджувачі, фільтри, голки, шприци та вкладиші в упаковку з інструкціями із застосування.

Комплекти за цим винаходом можуть включати один контейнер, який містить лікарську форму фармацевтичних композицій відповідно до цього винаходу з іншими компонентами чи без них (наприклад, інші сполуки або фармацевтичні композиції цих інших сполук) чи включати окремі контейнери для кожного компоненту.

Переважно, комплекти за винаходом включають композицію за винаходом, упаковану для використання, в комбінації з одночасним введенням другої сполуки, такої, як ад'юванти (наприклад, ГМ-КСФ), хіміотерапевтичний агент, природний продукт, гормон чи антагоніст, анти-ангіогенезний агент чи інгібітор, апоптоз-індукуючий агент або хелатор) чи їхню фармацевтичну композицію. Компоненти комплекту до введення пацієнту можуть бути завчасно змішані, чи
35 кожний компонент може бути в окремому контейнері. Компоненти комплекту можуть бути надані в одному чи кількох рідких розчинах, переважно, водному розчині, більш переважно, стерильному водному розчині. Компоненти комплекту також можуть надаватися як речовини у твердому стані, які можуть бути переведені на рідини шляхом додання прийнятних розчинників, котрі переважно містяться в іншому окремому контейнері.

Контейнер терапевтичного комплекту може являти собою флакон, пробірку, колбу, пляшку, шприц або будь-який інший засіб для вміщення твердої речовини чи рідини. Зазвичай, коли є більш ніж один компонент, комплект включає другий флакон чи другий контейнер, який дозволяє окреме дозування. Комплект може також включати інший контейнер для фармацевтично прийнятної рідини. Переважно, терапевтичний комплект буде включати апарат
45 (наприклад, одну чи кілька голок, шприци, очні піпетки, піпетку та ін.), який робить можливим введення речовин відповідно винаходу, що є компонентами цього комплекту.

Ця лікарська форма є формою, прийнятною для введення пептидів будь-яким зручним способом, наприклад, пероральним (ентеральним), назальним, очним, підшкірним, внутрішньошкірним, внутрішньом'язовим, внутрішньовенним або трансдермальним. Переважно, введення може здійснюватися підшкірно, та найбільш переважно, внутрішньошкірно інфузійним насосом.

Оскільки пептиди за винаходом були виділені з тканин раку підшлункової залози, лікарський засіб за винаходом переважно застосовується для лікування раку підшлункової залози.

Цей винахід також стосується способу отримання персоналізованого фармацевтичного засобу для застосування для конкретного пацієнта, який включає виготовлення фармацевтичної композиції, яка містить принаймні один пептид, вибраний із "сховища" заздалегідь "просіяних" TUMAP, в якому щонайменше один пептид, використаний у фармацевтичній композиції, вибраний таким чином, щоб підходити конкретному пацієнту. В одному з втілень фармацевтична композиція є вакциною. Спосіб може також бути

пристосованим для отримання клонів Т-клітин для подальшого використання, такого як виділення ТКР, або розчинних антитіл та інших варіантів лікування.

"Персоналізований фармацевтичний засіб" означає засоби лікування, спеціально адаптовані для конкретного пацієнта, які будуть застосовані для лікування лише цього конкретного пацієнта, включаючи активно персоналізовані протиракові вакцини і засоби адаптивної клітинної терапії з використанням аутологічних тканин, отриманих від пацієнта.

Термін "сховище" в контексті цього винаходу означає групу пептидів, яка заздалегідь пройшла "просіяння" (скринінг) на імуногенність і (або) надмірну презентацію у конкретному виді пухлин. Термін "сховище" не означає, що конкретні пептиди, що входять до складу вакцини, були заздалегідь виготовлені і зберігалися у фізичному об'єкті, хоча така можливість мається на увазі. Прямо передбачається, що пептиди можуть бути виготовлені *de novo* для кожної отриманої персоналізованої вакцини або вони можуть бути виготовлені заздалегідь і зберігатися. "Сховище" (наприклад, у формі бази даних) складається з пухлино-асоційованих пептидів, що були високо експресовані тканинами пухлин хворих на рак підшлункової залози пацієнтів із різними алелями HLA-A, HLA-B і HLA-C. Воно може містити пептиди, що зв'язані з молекулами MHC I класу і з молекулами MHC II класу або подовжені пептиди, що зв'язані з молекулами MHC I класу. На додаток до пухлино-асоційованих пептидів, отриманих із декількох тканин раку підшлункової залози, сховище може містити маркерні пептиди, що зв'язані з HLA-A*02 і HLA-A*24. Ці пептиди дозволяють кількісно порівняти інтенсивність Т-клітинної відповіді, індукованої TUMAP, і таким чином дозволяє зробити важливий висновок відносно здатності вакцини викликати протипухлинну відповідь. По-друге, вони виконують функцію важливих пептидів позитивного контролю, отриманих з "не-свого" антигену, у випадку, якщо у пацієнта не спостерігаються жодні вакцино-індуковані Т-клітинні відповіді на TUMAP, отримані зі "своїх" власних антигенів пацієнта. І по-третє, воно дозволяє зробити висновки щодо стану імунокомпетентності пацієнта.

TUMAP для "сховища" ідентифікуються за допомогою підходу інтегрованої функціональної геноміки, що поєднує аналіз генної експресії, мас-спектрометрію і Т-клітинну імунологію (XPresident®). Цей підхід гарантує, що тільки TUMAP, насправді присутні у великому відсотку пухлин, але не взагалі неекспресовані або лише мінімально експресовані на нормальних тканинах, будуть вибрані для подальшого аналізу. Для первинного вибору пептидів зразки раку підшлункової залози пацієнтів і зразки крові від здорових донорів аналізували з використанням поетапного підходу:

1. HLA-ліганди зі злоякісного матеріалу ідентифікували методом мас-спектрометрії

2. Аналіз експресії інформаційної рибонуклеїнової кислоти (іРНК) в усьому геномі використовували для ідентифікації генів, що надмірно експресовані у злоякісній тканині (раку підшлункової залози) у порівнянні з рядом нормальних органів і тканин

3. Ідентифіковані HLA-ліганди порівнювали з даними генної експресії Пептиди, надмірно або селективно презентовані на пухлинній тканині, переважно такі, що кодуються селективно експресованими або надмірно-експресованими генами, як було визначено на етапі 2, вважали прийнятними TUMAP-кандидатами для включення до складу мультипептидної вакцини.

4. Пошук літератури був проведений для ідентифікації додаткових свідочств, що підтверджують доречність використання ідентифікованих пептидів як TUMAP

5. Доречність надмірної експресії на рівні іРНК була підтверджена повторним виявленням вибраних TUMAP етапу 3 на пухлинній тканині і їх відсутністю (або рідким виявленням) на здорових тканинах.

6. Для оцінки того, чи є здійсненою індукція вибраними пептидами Т-клітинної відповіді *in vivo*, був проведений аналіз імуногенності *in vitro* з використанням Т-клітин людини, отриманих від здорових донорів, а також від пацієнтів, хворих на рак підшлункової залози.

В одному з аспектів пептиди проходять попередній скринінг на імуногенність перед тим, як їх включають до "сховища". Як приклад, що не має обмежувального значення, імуногенність пептидів, доданих до "сховища", визначають методом, що включає примування Т-клітин *in vitro* шляхом повторних стимуляцій CD8+Т-клітин від здорових донорів клітинами, що презентують штучний антиген, навантаженими комплексами пептид/МНС і антитілами проти CD28.

Цей метод є переважним для видів раку, що рідко спостерігаються, і для пацієнтів з рідкісними профілями експресії. На відміну від мультипептидних коктейлів зі сталим складом, які у даний час вже розроблені, "сховище" дозволяє забезпечити значно кращий збіг з вакциною реальної експресії антигенів у пухлині. Вибрані "готові для застосування" індивідуальні пептиди або комбінації декількох пептидів будуть використані для кожного пацієнта у багатоцільовому підході. Теоретично, підхід, який базується на виборі, наприклад, 5 різних антигенних пептидів із

бібліотеки з 50 пептидів, вже мав би привести приблизно до 17 мільйонів можливих складів лікарських препаратів.

В одному варіанті винаходу пептиди вибираються для включення до складу вакцини на основі їхньої прийнятності для конкретного пацієнта на основі способу за цим винаходом як вже описано в цьому документі або як викладено нижче.

З матеріалу пухлини і зразків крові пацієнта будуть зібрані дані щодо фенотипу HLA, транскриптомного і пептидомного аналізу з метою ідентифікувати найбільш прийнятні для кожного пацієнта пептиди "сховища" і унікальні для пацієнта (тобто мутовані) TUMAP. Будуть вибрані ті пептиди, які селективно або надмірно експресуються в пухлинах пацієнтів і, де можливо, демонструють сильну імуногенність *in vitro*, якщо вони були досліджені на зразках МКПК індивідуальних пацієнтів.

Переважно, пептиди, що входять до складу вакцини, ідентифіковані методом, що включає: (a) ідентифікацію пухлино-асоційованих пептидів (TUMAP), які презентуються зразком пухлини від конкретного пацієнта; (b) порівняння пептидів, ідентифікованих в (a), зі сховищем (базою даних) пептидів як зазначено вище; і (c) вибір принаймні одного пептиду зі сховища (базу даних), який корелює з пухлино-асоційованим пептидом, ідентифікованим у пацієнта. Наприклад, TUMAP, які презентуються зразком пухлини, ідентифікуються за допомогою: (a1) порівняння даних експресії зі зразка пухлини з даними експресії зі зразка нормальної тканини, що відповідає типу тканини зразка пухлини, для ідентифікації білків, які надмірно експресуються або аберантно експресуються у зразку пухлини; і (a2) проведення кореляції даних експресії з послідовностями лігандів МНС, зв'язаних із молекулою МНС I класу і (або) II класу, в зразку пухлини для ідентифікації лігандів МНС, отриманих із білків, що надмірно експресуються або аберантно експресуються пухлиною. Переважно, послідовності лігандів МНС ідентифікуються елюванням зв'язаних пептидів із їхніх комплексів із молекулами МНС, виділених із зразка пухлини, і секвенуванням елюованих лігандів. Переважно, зразок пухлини і нормальна тканина отримані від того самого пацієнта.

На додаток до (або як альтернатива йому) вибору пептидів з використанням моделі "сховища", TUMAP можуть бути ідентифіковані у пацієнта *de novo* і потім введені до складу вакцини. Як один приклад, TUMAP-кандидати можуть бути ідентифіковані у пацієнта шляхом (a1) порівняння даних експресії зі зразка пухлини з даними експресії зі зразка нормальної тканини, що відповідає типу тканини зразка пухлини, для ідентифікації білків, які надмірно експресуються або аберантно експресуються у зразку пухлини; і (a2) проведення кореляції даних експресії з послідовностями лігандів МНС, зв'язаних із молекулою МНС I класу і (або) II класу, в зразку пухлини для ідентифікації лігандів МНС, отриманих із білків, що надмірно експресуються або аберантно експресуються пухлиною. Як інший приклад, білки можуть бути ідентифіковані як такі, що містять мутації, які є унікальними для зразка пухлини, по відношенню до відповідної нормальної тканини конкретного пацієнта, а TUMAP можуть бути ідентифіковані як такі, що специфічно націлені на цю мутацію. Наприклад, геном пухлинної клітини і геном клітин відповідної нормальної тканини можливо секвенувати методом повногеномного секвенування: для викриття несинонімічних мутацій у білок-кодуючій ділянці генів геномні ДНК і РНК екстрагують із пухлинних тканин, а нормальну немутовану геномну ДНК лінії зародкових клітин екстрагували з моноклеарних клітин периферичної крові (МКПК). Використаний метод секвенування нового покоління (NGS) зводиться до повторного секвенування білок-кодуючих ділянок (ресеквенування екзому). З цією метою екзонну ДНК із зразків людини уловлюють за допомогою комплексів збагачення цільовими фрагментами, придбаних у постачальника, з наступним секвенуванням, наприклад, за допомогою HiSeq2000 (Illumina). Крім цього, іРНК пухлинних клітин секвенують для прямого кількісного визначення генної експресії і підтвердження того, що мутовані гени експресуються у пухлинах пацієнтів. Отримані мутації послідовностей зчитування обробляють з використанням програмно-реалізованих алгоритмів. Таблиця результатів містить мутації і показники генної експресії. Пухлинспецифічні соматичні мутації визначають шляхом порівняння з варіаціями зародкових ліній, що походять від МКПК, і розміщують у відповідності до пріоритету. Ідентифіковані *de novo* пептиди можуть згодом бути досліджені на імуногенність як викладено вище для "сховища", а і TUMAP-кандидати, що мають прийнятну імуногенність, вибирають для включення до складу вакцини.

В одному з прикладів втілень пептиди, що входять до складу вакцини, ідентифікуються таким чином: (a) ідентифікацією пухлино-асоційованих пептидів (TUMAP), які презентуються зразком пухлини від конкретного пацієнта описаними вище методами; (b) порівнянням пептидів, ідентифікованих в (a), зі сховищем пептидів, які пройшли попередній скринінг на імуногенність і на надмірну експресію у пухлинах у порівнянні з відповідною нормальною тканиною; (в) вибором принаймні одного пептиду зі сховища, який корелює з пухлино-асоційованим

пептидом, ідентифікованим у пацієнта, і г) необов'язково, вибором принаймні одного пептиду, ідентифікованого *de novo* в (а) і підтвердженням його імуногенності.

В одному з прикладів втілень пептиди, що входять до складу вакцини, ідентифікуються таким чином: (а) ідентифікацією пухлино-асоційованих пептидів (TUMAP), які презентуються зразком пухлини від конкретного пацієнта; і (б) вибором принаймні одного пептиду, ідентифікованого *de novo* в (а) і підтвердженням його імуногенності.

Після вибору пептидів для персоналізованої вакцини на основі пептиди виготовляється вакцина. Ця вакцина переважно є рідкою лікарською формою, що складається з окремих пептидів, розчинених у ДМСО концентрацією від 20 до 40 %, переважно приблизно від 30 до 35 %, такий як приблизно 33 % ДМСО.

Кожен пептид, який належить включити до композиції, розчиняють у ДМСО. Концентрацію розчинів окремих пептидів необхідно вибирати залежно від кількості пептидів, які належить включити до складу продукту. Розчини окремих пептидів у ДМСО змішують у рівних частинах, щоб отримати розчин, який містить усі пептиди, які належить включити до складу продукту, з концентрацією ~2,5 мг/мл для кожного пептиду. Змішаний розчин потім розводять у співвідношенні 1:3 водою для ін'єкцій з метою досягти концентрацію 0,826 мг/мл для кожного пептиду у 33 % ДМСО. Розведений розчин фільтрують через стерильний фільтр із розміром пор 0,22 мкм. Отримують нерозфасований кінцевий розчин.

Нерозфасований кінцевий розчин розливають по флаконах і зберігають при температурі - 20 °С аж до використання. Один флакон вміщує 700 мкл розчину, що містить 0,578 мг кожного пептиду. 500 мкл цього розчину (приблизно 400 мкг кожного пептиду) будуть використані для внутрішньошкірної ін'єкції.

На додаток до можливості використання для лікування раку, пептиди за цим винаходом можуть також використовуватися як діагностичні реактиви. Оскільки пептиди генерувалися з клітин раку підшлункової залози і оскільки було визначено, що ці пептиди не є присутніми у нормальних тканинах або присутні у низькій кількості, ці пептиди можуть використовуватися для діагностики наявності раку.

Присутність пептидів за цим винаходом на біоптатах тканин у зразках крові може допомогти патоморфологу в діагностуванні раку. Виявлення певних пептидів за допомогою антитіл, мас-спектрометрії або інших методів, відомих фахівцям у цій галузі, може надати патоморфологу інформацію, чи є тканина злоякісною або запаленою або взагалі ураженою хворобою, або може використовуватися як біомаркер раку підшлункової залози. Наявність груп пептидів може дозволити віднести хворі тканини до певного класу чи підкласу.

Виявлення пептидів на зразках хворої тканини дає можливість прийняти рішення відносно користі від методів лікування за участю імунної системи, особливо якщо відомо або передбачається, що Т-лімфоцити причетні до механізму дії. Втрата експресії МНС є добре відомим механізмом, за яким інфіковані або злоякісні клітини уникають імунного контролю. Отже, наявність пептидів свідчить про те, що цей механізм не використовується клітинами, що аналізуються.

Пептиди за цим винаходом можливо використовувати для аналізу відповіді лімфоцитів на дію таких пептидів, такої як реакція Т-клітин або відповідь антитіл на пептид або комплекс пептиду і молекул МНС. Ці відповіді лімфоцитів можливо використовувати як прогностичні маркери для прийняття рішень щодо наступних терапевтичних дій. Ці відповіді можна також використовувати як сурогатні маркери в імунотерапевтичних підходах, що мають на меті викликати відповіді лімфоцитів у різний спосіб, наприклад, вакцинацією білками, нуклеїновими кислотами, аутологічними матеріалами, адаптивним перенесенням лімфоцитів. В закладах, де застосовують генну терапію, для оцінки побічних ефектів рекомендується проаналізувати реакції лімфоцитів на пептиди. Моніторинг реакцій лімфоцитів може також бути цінним інструментом під час обстеження при подальшому спостереженні після трансплантації, наприклад, для виявлення реакцій "трансплантат проти хазяїна" та "хазяїн проти трансплантата".

Цей винахід буде проілюстрований наведеними нижче прикладами, які описують його переважні втілення, з посиланнями на супроводжувальні фігури, але не обмежуються наведеними тут. Для цілей цього винаходу всі цитовані джерела включені в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

На Фігурах 1А–С показана надмірна презентація різних пептидів у нормальних тканинах (темно-сірий колір) і тканинах раку підшлункової залози (світло-сірий колір). На Фігурі 1D показані усі лінії клітин (темно-сірий колір), нормальні тканини (сірий колір) і ракові тканини (світло-сірий колір), на яких був виявлений типовий пептид (FLFDGSA NLV) (SEQ ID NO.: 9). Фігура 1А) Ген: CTLA/CTLB, пептид: FLAQQESEI (A*02) (SEQ ID NO.: 1); тканини, показані зліва

направо: 1 жирова тканина, 3 надниркові залози, 2 артерії, 3 кісткових мозки, 7 головних мозків, 3 молочні залози, 13 товстих кишок, 1 яєчник, 4 стравоходи, 2 жовчних міхури, 3 серця, 12 нирок, 4 зразки лейкоцитів, 19 печінок, 43 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 2 периферичних нерви, 1 очерешина, 1 гіпофіз, 3 плеври, 1 передміхурова залоза, 6 прямих кишок, 3 скелетні м'язи, 3 шкіри, 2 тонкі кишки, 4 селезінки, 5 шлунків, 1 сім'яник, 2 тимуси, 3 щитоподібні залози, 2 матки, 2 вени, 6 підшлункових залоз, 18 раків підшлункової залози; Фігура 1B Ген: PLEC, пептид: SLQEEHVAVA (A*02), (SEQ ID NO.: 2); тканини, показані зліва направо: 1 жирова тканина, 3 надниркові залози, 2 артерії, 3 кісткових мозки, 7 головних мозків, 3 молочні залози, 13 товстих кишок, 1 яєчник, 4 стравоходи, 2 жовчних міхури, 3 серця, 12 нирок, 4 зразки лейкоцитів, 19 печінок, 43 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 2 периферичних нерви, 1 очерешина, 1 гіпофіз, 3 плеври, 1 передміхурова залоза, 6 прямих кишок, 3 скелетні м'язи, 3 шкіри, 2 тонкі кишки, 4 селезінки, 5 шлунків, 1 сім'яник, 2 тимуси, 3 щитоподібні залози, 2 матки, 2 вени, 6 підшлункових залоз, 18 раків підшлункової залози; Фігура 1C Ген: COL6A3, пептид: FLVDGSSAL (A*02) (SEQ ID NO.: 10); тканини, показані зліва направо: 1 жирова тканина, 3 надниркові залози, 2 артерії, 3 кісткових мозки, 7 головних мозків, 3 молочні залози, 13 товстих кишок, 1 яєчник, 4 стравоходи, 2 жовчних міхури, 3 серця, 12 нирок, 4 зразки лейкоцитів, 19 печінок, 43 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 2 периферичних нерви, 1 очерешина, 1 гіпофіз, 3 плеври, 1 передміхурова залоза, 6 прямих кишок, 3 скелетні м'язи, 3 шкіри, 2 тонкі кишки, 4 селезінки, 5 шлунків, 1 сім'яник, 2 тимуси, 3 щитоподібні залози, 2 матки, 2 вени, 6 підшлункових залоз, 18 раків підшлункової залози; Фігура 1D COL6A3, пептид: FLFDGSANLV (A*02) (SEQ ID NO.: 9); тканини, показані зліва направо: 5 ліній раку підшлункової залози, 7 нормальних тканин (1 товста кишка, 6 легенів), 85 ракових тканин (2 раки молочної залози, 6 раків товстої кишки, 4 раки стравоходу, 3 раки печінки, 56 раків легенів, 5 раків підшлункової залози, 3 раки прямої кишки, 1 меланома, 5 раків шлунка). Набір нормальних тканин був таким самим, як у A–C, але тканини без виявлення не показані. Розбіжність між списками видів пухлин на Фігурі 1D і у таблиці 4 можна пояснити більш суворими критеріями вибору, застосованими щодо таблиці 4 (докладну інформацію див. у таблиці 4). На Фігурі 1D показані усі зразки з виявлюваною презентацією пептиду Y, незалежно від показників надмірної презентації і технічної перевірки якості зразків.

На Фігурах 1E – I показані усі лінії клітин (темно-сірий колір), нормальні тканини (сірий колір) і ракові тканини (світло-сірий колір), на яких був виявлений типовий пептид. Фігура 1E) Пептид: SVDVSPPKV (A*02) (SEQ ID NO.: 4); тканини, показані зліва направо: 1 лінія клітин, 3 первинні культури, 1 шкіра, 1 рак жовчних протоків, 3 раки головного мозку, 1 рак молочної залози, 4 раки стравоходу, 5 раків нирки, 11 раків легенів, 1 рак лімфатичного вузла, 1 рак яєчника, 3 раки підшлункової залози, 1 рак передміхурової залози, 3 раки шкіри, 2 раки сечового міхура, 3 раки матки; Фігура 1F) Пептид: LLVDDSLHTV (A*02) (SEQ ID NO.: 5); тканини, показані зліва направо: 2 лінії клітин, 1 первинна культура, 1 рак жовчних протоків, 2 раки головного мозку, 1 рак молочної залози, 3 раки стравоходу, 2 раки жовчного міхура, 2 раки нирки, 2 раки печінки, 3 раки легенів, 7 раків яєчника, 2 раки підшлункової залози, 3 раки шкіри, 1 рак шлунка, 1 рак матки; Фігура 1G) Пептид: IVDDLTLNL (A*02) (SEQ ID NO.: 8); тканини, показані зліва направо: 1 лінія клітин, 1 рак товстої кишки, 2 раки стравоходу, 2 раки жовчного міхура, 5 раків легенів, 1 рак лімфатичного вузла, 1 рак підшлункової залози, 2 раки шкіри, 4 раки шлунка, 1 рак сечового міхура, 4 раки матки; Фігура 1H) Пептид: LLAGQTYHV (A*02) (SEQ ID NO.: 13); тканини, показані зліва направо: 6 ліній клітин, 1 легеня, 1 плацента, 2 раки жовчних протоків, 3 раки молочної залози, 2 раки товстої кишки, 2 раки стравоходу, 2 раки жовчного міхура, 1 рак печінки, 36 раків легенів, 3 раки яєчника, 3 раки підшлункової залози, 1 рак прямої кишки, 3 раки сечового міхура; і Фігура 1I) Пептид: VLAKEPGVISV (A*02) (SEQ ID NO.: 14); тканини, показані зліва направо: 7 ліній клітин, 1 легеня, 1 рак жовчних протоків, 4 раки молочної залози, 1 рак товстої кишки, 2 раки стравоходу, 1 рак жовчного міхура, 36 раків легенів, 1 рак яєчника, 3 раки підшлункової залози, 2 раки прямої кишки, 1 рак шлунка, 1 рак сечового міхура.

На Фігурі 2 показані приклади профілів експресії (відносна експресія у порівнянні з нормальною ниркою) вихідних генів за цим винаходом, які в значній мірі надмірно або виключно експресуються у пухлинах раку підшлункової залози у панелі нормальних тканин (темно-сірий колір) і 11 зразках раку підшлункової залози (сірий колір). Фігура 2A) LAMC2; тканини зліва направо: 1 надниркова залоза, 1 артерія, 1 кістковий мозок, 1 головний мозок (весь), 1 молочна залоза, 1 товста кишка, 1 стравохід, 1 серце, 3 нирки, 1 зразок лейкоцитів, 1 печінка, 1 легеня, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 1 підшлункова залоза, 1 плацента, 1 передміхурова залоза, 1 слинна залоза, 1 скелетна м'яз, 1 шкіра, 1 тонка кишка, 1 селезінка, 1 шлунок, 1 сім'яник, 1 тимус, 1 щитоподібна залоза, 1 сечовий міхур, 1 шийка матки, 1 матка, 1 вена, 18 раків підшлункової залози; Фігура 2B) VCAN, тканини зліва направо: 1 надниркова залоза, 1 артерія, 1

кістковий мозок, 1 головний мозок (весь), 1 молочна залоза, 1 товста кишка, 1 стравохід, 1 серце, 3 нирки, 1 зразок лейкоцитів, 1 печінка, 1 легеня, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 1 підшлункова залоза, 1 плацента, 1 передміхурова залоза, 1 слинна залоза, 1 скелетна м'яз, 1 шкіра, 1 тонка кишка, 1 селезінка, 1 шлунок, 1 сім'яник, 1 тимус, 1 щитоподібна залоза, 1 сечовий міхур, 1 шийка матки, 1 матка, 1 вена, 18 раків підшлункової залози; Фігура 2C) FAP, тканини зліва направо: 1 надниркова залоза, 1 артерія, 1 кістковий мозок, 1 головний мозок (весь), 1 молочна залоза, 1 товста кишка, 1 стравохід, 1 серце, 3 нирки, 1 зразок лейкоцитів, 1 печінка, 1 легеня, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 1 підшлункова залоза, 1 плацента, 1 передміхурова залоза, 1 слинна залоза, 1 скелетна м'яз, 1 шкіра, 1 тонка кишка, 1 селезінка, 1 шлунок, 1 сім'яник, 1 тимус, 1 щитоподібна залоза, 1 сечовий міхур, 1 шийка матки, 1 матка, 1 вена, 18 раків підшлункової залози.

На Фігурі 3 показані типові дані дослідження імуногенності: результати проточної цитометрії після пептид-специфічного мультимерного забарвлювання. На Фігурах 3 (C і D) показані типові результати відповіді *in vitro* пептид-специфічних CD8+T-клітин здорового HLA-A*02+ донора. CD8-позитивні T-клітини були примовані з використанням штучних АПК, навантажених моноклональними антитілами проти CD28 і HLA-A*02 у комплексі з пептидом з послідовністю Seq ID No 3 (C, ліва панель) або Seq ID No 50 (D, ліва панель), відповідно. Після трьох циклів стимуляції були проведені визначення клітин, що реагують із пептидом, за допомогою подвійного фарбування мультимерів з A*02/Seq ID No 3 (C) або A*02/Seq ID No 50 (D). На правих панелях (C і D) показане контрольне забарвлення клітин, стимульованих невідповідними комплексами A*02/пептид. Проводили "гейтування" життєздатних поодиноких клітин на належність до CD8+ лімфоцитів. Булеві гейтування допомогли виключити хибнопозитивні відповіді, виявлені з мультимерами, специфічними до різних пептидів. Наведені частоти виявлення специфічних мультимер-позитивних клітин серед CD8+ лімфоцитів.

Приклади

Приклад 1: Ідентифікація і кількісне визначення рівнів пухлино-асоційованих пептидів, презентованих на поверхні клітин

Зразки тканин

Зразки тканин пухлин пацієнтів були отримані з Asterand (Детройт, Мічиган, США і Ройстон, Хартфордшир, Велика Британія), Geneticist Inc. (Глендейл, Каліфорнія, США), Університетської клініки Гейдельберга, Університетської клініки Тюбінгена. Нормальні тканини були отримані з Bio-Options Inc. (Брі, Каліфорнія, США), BioServe (Белтсвілл, Меріленд, США), Capital BioScience Inc. (Роквілл, Меріленд, США), Geneticist Inc. (Глендейл, Каліфорнія, США), Університетської клініки Женеви, Університетської клініки Гейдельберга, Університету медицини префектури Кіото (KPU); Університетської клініки Мюнхена, ProteoGenex Inc., (Калвер Сіті, Каліфорнія, США), Університетської клініки Тюбінгена. До хірургічного видалення тканин або аутопсії була одержана письмова інформована згода від усіх пацієнтів. Тканини були заморожені шокним способом безпосередньо після вирізування та зберігались до виділення TUMAP при температурі -70 °C або нижче.

Виділення пептидів HLA із зразків тканин

Пули пептидів HLA із заморожених шокним способом зразків тканин були одержані імунним осадженням із твердих тканин відповідно до незначно зміненого протоколу (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) з використанням HLA-A*02-специфічного антитіла BB7.2, використанням HLA-A, -B, C-специфічного антитіла W6/32, використанням CNBr-активованої сефарози, кислотної обробки та ультрафільтрації.

Аналіз методом мас-спектрометрії

Одержані пули пептидів HLA розділялися відповідно до їхньої гідрофобності із використанням зворотно-фазної хроматографії (nanoAcquity UPLC system, Waters), та елюйовані пептиди були проаналізовані на гібридному мас-спектрометрі LTQ-velos (ThermoElectron) з джерелом іонів типу електроспрей (ESI). Пептидні пули були завантажені безпосередньо на аналітичну мікрокапілярну колонку з плавленого кварцу (75 мкм в. д. x 250 мм), заповнену зворотно-фазним сорбентом C18 розміром 1,7 мкм (Waters), із застосуванням швидкості потоку 400 нл на хвилину. Згодом пептиди були розділені з використанням двоетапного 180-хвилинного бінарного градієнту з 10 % до 33 % розчинника B при швидкості потоку 300 нл на хвилину. Градієнт був забезпечений розчинником A (0,1 % мурашиної кислоти у воді) та розчинником B (0,1 % мурашиної кислоти в ацетонітрилі). Був використаний скляний капіляр із золотим покриттям (PicoTip, New Objective) для введення в джерело іонів нано-ESI. Мас-спектрометри LTQ-Orbitrap працювали в інформаційно-залежному режимі з використанням стратегії TOP5. Стисло, цикл сканування був ініційований з повним скануванням при високій точності маси на Orbitrap (R=30 000) з наступними сканами MC/MC також на Orbitrap (R=7500)

на 5 найбільш поширених прекурсорних іонах з динамічним виключенням раніше вибраних іонів. ТанDEMні мас-спектри були інтерпретовані програмою SEQUEST з додатковим контролем в ручному режимі. Ідентифікована пептидна послідовність була підтверджена порівнянням генерованої моделі фрагментації природного пептиду з моделлю фрагментації синтетичного

5

контрольного пептиду з ідентичною послідовністю.

Відносно кількісне визначення на основі даних PX-МС без використання ізотопної мітки здійснювалось підрахунком іонів, тобто екстракцією і аналізом компонентів PX-МС (Mueller et al., 2007). Цей метод базується на припущенні, що площі піків PX-МС сигналів пептиду корелюють з його кількістю у зразку. Екстраговані компоненти були потім піддані обробці методами

10 деконволюції за зарядовими станами і вирівнювання часу утримання (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Нарешті, компоненти PX-МС були піддані обробці методом перехресних посилення з результатами ідентифікації послідовностей з метою об'єднати кількісні дані різних зразків і тканин у профілі презентації пептидів. Кількісні дані пройшли двоярусну нормалізацію відповідно до основної тенденції, з урахуванням варіабельності технічних і біологічних

15 повторних вимірів. Отже, кожний ідентифікований пептид можна зв'язати з кількісними даними, що дозволяє провести відносний кількісний аналіз між зразками і тканинами. Крім того, усі кількісні дані, отримані для пептидів-кандидатів, були перевірені вручну для забезпечення погодженості даних і перевірки точності автоматичного аналізу. Профілі презентації були розраховані для кожного пептиду, які дозволяють оцінити середній рівень презентації у зразку, а

20 також варіацію повторних вимірювань. Профіль зіставляє зразки раку підшлункової залози з фоновим рівнем зразків нормальних тканин. Профілі презентації типових надмірно презентованих пептидів показані на Фігурі 2. Показники презентації типових пептидів наведені у Таблиці 8.

Таблиця 16. Показники презентації. У таблиці наведений перелік пептидів, які надзвичайно

25 надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (+++), в значній мірі надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (++) або надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (+).

Таблиця 17

SEQ ID No.	Послідовність	Презентація пептидів
1	FLAQQESEI	+++
2	SLQEEHVAVA	++
3	ALLTFMEQV	+++
4	SVDVSPPKV	+
5	LLVDDSFLLHTV	+++
7	AQQESEIAGI	+++
8	IVDDLTINL	+++
9	FLFDGSSANLV	+++
10	FLVDGSSAL	+++
11	FLYKIIDEL	+++
12	FVSEIVDTV	+++
13	LLAGQTYHV	++
14	VLAKEPGVISV	+
15	SLANNVTSTV	+
16	APVNVTTTEVKSV	+++
17	FLKSGDAAIV	+++
18	SLLDDELMSL	++
19	HLAPETDEDDL	+++
20	RLAGDGVGAV	++
21	HLMDQPLSV	+++
23	SLSAFTLFL	+
24	GLLEELVTV	+++
25	SLKEEVGEEAI	+
26	SLKEEVGEEAIV	++
29	FLQEYLDAL	+++
31	SLAAAAGKQEL	+++
32	SLAAAAGKQELA	+++
33	SLDSRLELA	+++

Таблиця 18 (продовження)

SEQ ID No.	Послідовність	Презентація пептидів
34	MLMPVHFLL	+++
35	VMDSGDGVTHTV	+
36	KQEYDESGPSIVH	+++
37	GLLKKINSV	+++
38	NLVEKTPALV	+++
39	TLLSNLEEA	+
40	FILDSAETTTL	+++
41	FLLDGSEGV	+++
42	KLVDKSTEL	+++
43	RLDQRPQI	++
46	TFAPVNVTTTEVKSV	+
47	KMDASLGNLFA	+++
48	ALTQTGGPHV	+++
49	NLKGTFATL	+++
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	+++
52	RMVEEIGVEL	++
56	GLLDYATGAIGSV	+++
57	FLGKVVIDV	+++
58	GLAAFKAFL	+++
59	KLFNLSKEDDV	+++
61	ALEKDYEEVGV	+++
62	ALEKDYEEV	+++
63	FAGDDAPR	+++
64	FLVSNMLLAEA	+++
66	ALLSGLREA	+++
67	KMFFLIDKV	+++
68	KLLTEVHAA	+++
70	FLVDGSWSV	+++
71	FLLDGSANV	+++
74	KIQEILTQV	+++
75	RLDDLKMTV	++
76	RLLDSVSRL	+
77	GLTDNIHLV	+++
79	VLAPRVLRA	+
80	TLYPHTSQV	+
81	AMSSKFFLV	+++
82	SISDVIAQV	+++
83	FLIDSSEGV	+++
84	NLLDLDYEL	+++
85	TVAEVIQSV	++
86	SLLAQNTSWLL	++
87	LLLGSPAAA	+++

Приклад 2

Профілі експресії генів, що кодують пептиди за винаходом

- 5 Надмірна презентація або специфічна презентація пептиду пухлинних клітинах у порівнянні з нормальними клітинами є достатньою для можливості його використання в імунотерапії, а деякі пептиди є пухлино-специфічними незважаючи на те, що їхній вихідний білок зустрічається також у нормальних тканинах. Все ж, отримання профілю експресії іРНК додає додатковий рівень безпеки у виборі пептидних мішеней для імунотерапії. Це особливо важливо для
- 10 варіантів терапії з високим ризиком для безпеки, таких як ТКР із дозрілою афінністю, де ідеальний пептид буде отриманий з білка, унікального для пухлини і який не виявлений у нормальних тканинах.

Джерела та приготування РНК

Зразки тканин, видалені хірургічним шляхом, були придбані у зазначених вище джерел (див. Приклад 1) після одержання письмової інформованої згоди від кожного пацієнта. Зразки пухлинної тканини були миттєво заморожені в рідкому азоті безпосередньо після хірургічної операції та пізніше гомогенізовані з використанням ступки та товчача під рідким азотом.

Тотальна РНК була приготована з цих зразків з використанням реактиву TRI (Ambion, Дармштадт, Німеччина), з наступним очищенням за допомогою RNeasy (QIAGEN, Хільден, Німеччина); обидві методики виконувались за протоколом виробника.

Тотальна РНК зі здорових тканин людей була одержана комерційним шляхом (Ambion, Хантингтон, Велика Британія; Clontech, Гейдельберг, Німеччина; Stratagene, Амстердам, Нідерланди; BioChain, Хейард, Каліфорнія, США). РНК від кількох осіб (від 2 до 123 осіб) були змішані таким чином, щоб РНК від кожної особи була рівнозважена.

Якість та кількість усіх зразків РНК були оцінені на біоаналізаторі Agilent 2100 (Agilent, Вальдброн, Німеччина), з використанням комплекту RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Експерименти з використанням мікрочипів

Аналіз генної експресії усіх зразків РНК пухлинних і нормальних тканин був виконаний з використанням олігонуклеотидних мікрочипів Affymetrix Human Genome (HG) U133A або HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Санта Клара, Каліфорнія, США). Усі етапи виконувались відповідно до посібника Affymetrix. Стисло, дволанцюгова кДНК була синтезована з 5–8 мкг тотальної РНК, з використанням SuperScript RTII (Invitrogen) та оліго-dT-T7-праймеру (MWG Biotech, Еберсберг, Німеччина), як описано в посібнику. Транскрипція In vitro була виконана з використанням комплекту маркування РНК-транскриптів BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фармінгдейл, Нью-Йорк, США) для чипів U133A або комплекту GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипів U133 Plus 2.0, після чого були здійснені кРНК-фрагментація, гібридизація та забарвлювання стрептавідин-фікоеритрином та біотинільованим анти-стрептавідиновим антитілом (Molecular Probes, Лейден, Нідерланди). Зображення були скановані приладом Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) або Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0). Дані аналізувалися за допомогою програми GCOS (Affymetrix), з використанням стандартних установок для усіх параметрів. Для нормалізації були застосовані 100 службових генів, наданих компанією Affymetrix. Відносні значення експресії були розраховані по відношенням логарифмів зареєстрованих сигналів, наданим комп'ютерною програмою, причому значення для нормального зразка тканин нирки було довільно встановлене на 1,0. Типові профілі експресії вихідних генів цього винаходу, які в значній мірі надмірно або виключно експресуються при раку підшлункової залози, показані на Фігурі 1. Показники презентації додаткових типових генів наведені у Таблиці 9.

Таблиця 19. Показники презентації У таблиці наведений перелік пептидів, які отримані з генів, що надзвичайно надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (+++), в значній мірі надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (++) або надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (+).

Таблиця 20

SEQ ID No	Послідовність	Експресія генів
3	ALLTFMEQV	++
4	SVDVSPPKV	+
6	VLISLKQAPLV	+
13	LLAGQTYHV	+
15	SLANNVTSV	+
16	APVNVTTTEVKSV	+
20	RLAGDGVGAV	+
23	SLSAFTLFL	+
25	SLKEEVGEEAI	++
27	YLQGQRLDNV	+
30	VVDEGPTGV	++
36	KQEYDESGPSIVH	+
43	RLDQRVPQI	+
44	VLLDKIKNLQV	+
46	TFAPVNVTTTEVKSV	++
47	KMDASLGNLFA	+
48	ALTQTGGPHV	+

Таблиця 21 (продовження)

SEQ ID No	Послідовність	Експресія генів
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	++
52	RMVEEIGVEL	+
57	FLGKVVIDV	+
58	GLAAFKAFI	+
59	KLFNLSKEDDV	+
61	ALEKDYEEVGV	+++
62	ALEKDYEEV	+++
66	ALLSGLREA	++
67	KMFFLIDKV	+
71	FLLDGSANV	+
73	TLVAIVVGV	++
75	RLDDLKMTV	++
76	RLLDSVSRL	+++
78	TLSSIKVEV	+++
81	AMSSKFFLV	++

Приклад 3

Імуногенність In vitro презентованих МНС I класу пептидів

- 5 Щоб отримати інформацію стосовно імуногенності TUMAP за цим винаходом, автори винаходу провели дослідження з використанням примування Т-клітин in vitro на основі повторної стимуляції CD8+Т-клітин штучними антиген-презентуючими клітинами (штучними АПК), навантаженими комплексами пептид/МНС і антитілами проти CD28. У такий спосіб була показана імуногенність на цей час 22 TUMAP за цим винаходом, рестрикованих за HLA-A*0201, що продемонструвало, що ці пептиди є епітопами Т-клітин, проти яких в організмі людини існують попередники CD8+Т-клітин (Таблиця 10).

Примування CD8+Т-клітин in vitro

- 15 Для проведення стимуляції in vitro штучними антиген-презентуючими клітинами, завантаженими комплексом пептид-МНС (pMHC) та антитілами проти CD28, спочатку були виділені CD8+Т-клітини зі свіжих продуктів лейкофезу HLA-A*02 шляхом позитивного відбору з використанням анти-CD8 мікрогранул (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Німеччина) здорових донорів, отриманих із Університетської клініки міста Мангейм, Німеччина, після одержання інформованої згоди.

- 20 МКПК і виділені CD8+-лімфоцити інкубували аж до використання в Т-клітинному середовищі (TCM), що складається з RPMI-Glutamax (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина) з додаванням 10 % термічно інактивованої АВ-сироватки людини (PAN-Biotech, Ейденбах, Німеччина), 100 Од/мл пеніциліну/100 мкг/мл стрептоміцину (Cambrex, Кельн, Німеччина), 1 мМ пірувату натрію (CC Pro, Обердорла, Німеччина), 20 мкг/мл гентаміцину (Cambrex). Цитокіни у концентраціях 2,5 нг/мл ІЛ-7 (PromoCell, Гейдельберг, Німеччина) та 10 Од/мл ІЛ-2 (Novartis Pharma, Нюрнберг, Німеччина) також додавалися до TCM на цьому етапі культивування.

- 25 Приготування мікросфер, покритих pMHC і антитілами проти CD28, Т-клітинні стимуляції та зчитування виконувалися у добре вивченій системі in vitro з використанням чотирьох різних молекул pMHC для кожної стимуляції і 8 різних молекул pMHC для кожної умови зчитування.

- 30 Очищені костимулювальні антитіла мишачого IgG2a проти CD28 людини Ab 9.3 (Jung et al., 1987) були хімічно біотинільовані за допомогою сульфо-N-гідроксисукцинімідобіотину, як рекомендовано виробником (Perbio, Бонн, Німеччина). Використовували полістирольні гранули діаметром 5,6 мкм, покриті стрептавідином (Bangs Laboratories, Іллінойс, США).

- 35 pMHC, використаними як позитивний і негативний контроль, були A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV з модифікованого Melan-A/MART-1) та A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI (SEQ ID No. 89) з DDX5), відповідно.

- 40 В 96-лункові планшети вносили 800 000 мікрогранул/200 мкл у присутності 4 × 12,5 нг різних біотинільованих комплексів pMHC, промивали та додавали 600 нг біотинільованих антитіл проти CD28 в об'ємі 200 мкл. Стимуляція була проведена в планшетах на 96 лунок шляхом спільного інкубування 1 × 10⁶ CD8+Т-клітин із 2 × 10⁵ промитих мікрогранул з покриттям у 200 мкл TCM з додаванням 5 нг/мл ІЛ-12 (PromoCell) протягом 3 днів за температури 37 °C. Половина середовища була потім замінена свіжим TCM з додаванням 80 Од/мл ІЛ-2, та інкубування

продовжували 4 дні за 37 °С. Цей цикл стимуляцій був виконаний загалом три рази. Для зчитування з рМНС-мультимерів з використанням 8 різних молекул рМНС для кожної умови зчитування застосовувалося двомірне структурне кодування як описано раніше (Andersen et al., 2012) з невеликими модифікаціями, які стосуються зв'язування з п'ятьма різними флуорохромами. Нарешті, був проведений аналіз мультимерів за допомогою забарвлювання клітин барвником для визначення їхньої життєздатності Live/dead у ближньому ІК-діапазоні (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина), клону антитіл CD8-FITC SK1 (BD, Гейдельберг, Німеччина) і флуоресцентних рМНС-мультимерів. Для аналізу використовували цитометр BD LSRII SORP, обладнаний відповідними лазерами і фільтрами. Пептидо-специфічні клітини були розраховані як відсоток від загальної кількості CD8-позитивних клітин. Оцінка результатів мультимерного аналізу була виконана за допомогою комп'ютерної програми FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Примування *in vitro* специфічних мультимер-позитивних CD8+ лімфоцитів було визначене порівнянням зі стимуляціями негативних контролів. Імуногенність для даного антигену визначалася, якщо було виявлено, що принаймні одна оцінювана *in vitro* стимульована лунка одного здорового донора містить специфічні CD8+Т-клітини після стимуляції *in vitro* (тобто коли ця лунка містила хоча б 1 % специфічних мультимер-позитивних серед CD8+Т-клітин та відсоток специфічних мультимер-позитивних клітин був принаймні в 10 разів більше медіанного значення стимуляцій відповідних негативних контролів).

Імуногенність *in vitro* для пептидів раку підшлункової залози

Для перевірених пептидів HLA I класу імуногенність *in vitro* можна продемонструвати генерацією пептидо-специфічних Т-клітинних ліній. Типові результати цитометрії після TUMAP-специфічного мультимерного забарвлення для двох пептидів за винаходом показані на Фігурі 3, разом із відповідними негативними контролями. Результати для 2 пептидів за винаходом зведені у Таблицю 10.

Типові результати експериментів по визначенню імуногенності *in vitro*, проведених подавцем заявки, для пептидів за винаходом. <20 % = +; 20 % – 49 % = ++; 50 % – 69 % = +++; >= 70 % = ++++

Таблиця 10

Імуногенність *in vitro* пептидів HLA класу I за винаходом

Seq ID	лунки	донори
69	++	++++
87	+	+++

Результати для 7 додаткових пептидів за винаходом зведені у Таблицю 10B.

Типові результати експериментів по визначенню імуногенності *in vitro*, проведених подавцем заявки, для пептидів за винаходом. <20 % = +; 20 % – 49 % = ++; 50 % – 69 % = +++; >= 70 % = ++++

Таблиця 10B

Імуногенність *in vitro* пептидів HLA класу I за винаходом

Seq ID No	Послідовність	Позитивні лунки [%]
3	ALLTFMEQV	++
20	RLAGDGVGAV	++++
21	HLMDQPLSV	+
23	SLSAFTLFL	++
34	MLMPVHFL	+
37	GLLKKINSV	+
50	ALAAILTRL	+++

Приклад 4

Синтез пептидів

Усі пептиди були синтезовані стандартним і широко використовуваним методом твердофазного синтезу пептидів за стратегією Fmoc. Ідентичність і чистоту кожного окремого пептиду визначали методами мас-спектрометрії і аналітичної ЗФ-ВЕРХ. Пептиди одержували у вигляді білих або брудно-білих ліофілізатів (солей фторацетатів) чистотою >50 %. Усі TUMAP переважно вводять у вигляді трифторацетатних солей або ацетатних солей, використання інших солей також можливе.

Приклад 5

Аналіз зв'язування з МНС

Пептиди-кандидати для Т-клітинної терапії за цим винаходом були додатково перевірені на здатність зв'язуватися з МНС (афінність). Окремі комплекси пептид-МНС були отримані УФ-індукованим обміном лігандів, за якого УФ-чутливі пептиди розщеплюються під дією УФ-випромінювання, і аналізується продукт обміну з пептидом, що вивчається. Тільки пептиди-кандидати, які здатні ефективно зв'язуватися з пептид-сприйнятливими молекулами МНС і стабілізувати їх, попереджають дисоціацію комплексів із МНС. Для визначення виходу реакції обміну проводили аналіз методом ELISA на основі виявлення легких ланцюгів ($\beta 2m$) стабілізованих комплексів із МНС. Аналіз проводили згідно з загальним описом у роботі Rodenko і співавт. (Rodenko et al., 2006).

96-лункові планшети MAXISorp (NUNC) були покриті протягом ночі розчином 2 мкг/мл стрептавідину у PBS при кімнатній температурі, 4 рази промиті і блоковані протягом 1 год. при 37 °C у 2 % розчині БСА, що містить блокувальний буфер. Ренатуровані мономерні HLA-A*02:01/MLA-001 використовувались як стандарти, охоплюючи діапазон 15–500 нг/мл. Мономерні комплекси пептид-МНС, продукти реакції обміну, що протікає під дією УФ-випромінювання, розводили у 100 разів у блокувальному буфері. Зразки інкубували протягом 1 год. за температури 37 °C, промивали чотири рази, інкубували з 2 мкг/мл кон'югованих із пероксидазою хрину антитіл проти $\beta 2m$ протягом 1 год. за температури 37 °C, знову промивали і визначали з розчином ТМБ, реакцію зупиняли за допомогою NH_2SO_4 . Поглинання вимірювали при 450 нм. Пептиди-кандидати, що демонстрували високий вихід реакції обміну (переважно вище 50 %, найбільш переважно вище 75 %) є зазвичай переважними для синтезу і продукції антитіл або їх фрагментів і (або) рецепторів Т-клітин або їх фрагментів, оскільки вони показують достатню авідність до молекул МНС і попереджають дисоціацію комплексів МНС.

Таблиця 11

Показники зв'язування з молекулами МНС І класу
 <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 % = +++; > 75 % = ++++

SEQ ID No	Послідовність	Обмін пептидів
1	FLAQGESEI	++
2	SLQEEHVAVA	++
3	ALLTFMEQV	+++
4	SVDVSPPKV	++
5	LLVDDSFLHTV	+++
6	VLISLKQAPLV	++
7	AQGESEIAGI	++
8	IVDDLITNL	++
9	FLFDGSANLV	++
10	FLVDGSSAL	++
11	FLYKIIDEL	+++
12	FVSEIVDTV	+++
13	LLAGQTYHV	++
14	VLAKEPGVISV	++
15		++
16		++
17	SLANNVTSV	++
18	APVNVTTTEVKSV	++
20	RLAGDGVGAV	++

Таблиця 11 (продовження)

SEQ ID No	Послідовність	Обмін пептидів
1	FLAQQESEI	++
21	HLMDQPLSV	++
22	TLDGAAVNQV	++
23	SLSAFTLFL	++
24	GLLEELVTV	++
25	SLKEEVGEEAI	++
26	SLKEEVGEEAIV	++
27	YLQGGRLDNV	++
28	YLQGGRLDNVV	++
29	FLQEYLDAL	+++
30	VVDEGPTGV	++
31	SLAAAAGKQEL	++
32	SLAAAAGKQELA	+
33	SLDSRLELA	++
34	MLMPVHFL	++++
35	VMDSGDGVTHTV	++
37	GLLKKINSV	++
38	NLVEKTPALV	+++
39	TLLSNLEEA	++
40	FILDSAETTTL	++
41	FLLDGSEGV	+++
42	KLVDKSTEL	++
43	RLDQRPQI	++
44	VLLDKIKNLQV	++
46	TFAPVNVTTTEVKSV	++
47	KMDASLGNLFA	++++
48	ALTQTGGPHV	++
49	NLKGTFATL	+
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	++
52	RMVEEIGVEL	++
53	SSFGGLGGGSV	+
54	VLLSEIEVA	++
55	YLDAMMNEA	++
56	GLLDYATGAIGSV	+++
57	FLGKVVIDV	++++
58	GLAAFKAF	+++
59	KLFNLSKEDDV	++
60	YLEEDVYQL	++
64	FLVSNMLLAEA	+++
65	YLYDSETKNA	++
66	ALLSGLREA	+++
67	KMFFFLIDKV	+++

Список посилань

- Agesen, T. H. et al., Gut 61 (2012)
- Alhumaidi, A., Indian J Dermatol.Venereol.Leprol. 78 (2012)
- Allison, J. P. et al., Science 270 (1995)
- 5 Amatschek, S. et al., Cancer Res 64 (2004)
- Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. 7 (2012)
- Appay, V. et al., Eur.J Immunol. 36 (2006)
- Appetecchia, M. et al., J Exp.Clin Cancer Res 29 (2010)
- Arafat, H. et al., Surgery 150 (2011)
- 10 Ariga, N. et al., Int J Cancer 95 (2001)
- Baek, G. et al., Cell Rep. 9 (2014)
- Bai, L. et al., J Cell Biochem. 113 (2012)
- Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001)
- Bausch, D. et al., Clin Cancer Res 17 (2011)
- 15 Beatty, G. et al., J Immunol 166 (2001)
- Beggs, J. D., Nature 275 (1978)
- Bell, J. L. et al., Cell Mol Life Sci. 70 (2013)
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995)
- 20 Bera, T. K. et al., Cancer Res 66 (2006)
- Berndt, S. I. et al., Nat Genet. 45 (2013)
- Blanch, A. et al., PLoS.One. 8 (2013)
- Blenk, S. et al., BMC.Cancer 8 (2008)
- Bo, H. et al., BMC.Cancer 13 (2013)
- 25 Bouameur, J. E. et al., J Invest Dermatol. 134 (2014)
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng 16 (2003)
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brendle, A. et al., Carcinogenesis 29 (2008)
- Brossart, P. et al., Blood 90 (1997)
- 30 Brown, S. G. et al., Prostate 75 (2015)
- Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004)
- Calmon, M. F. et al., Neoplasia. 11 (2009)
- Cao, H. H. et al., Oncotarget. (2014)
- Cappello, F. et al., Curr.Pharm.Des 19 (2013)
- 35 Cappello, F. et al., Cancer Biol.Ther 7 (2008)
- Cappello, F. et al., Front Biosci. (Schol.Ed) 3 (2011)
- Capulli, M. et al., J Bone Miner.Res 27 (2012)
- Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. 53 (2004)
- Casagrande, G. et al., Haematologica 91 (2006)
- 40 Catanzaro, J. M. et al., Nat Commun. 5 (2014)
- Chang, K. W. et al., Anticancer Res. 31 (2011)
- Chang, K. W. et al., Hepatol.Res 36 (2006)
- Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. 65 (2004)
- Chaudhury, A. et al., Nat Cell Biol. 12 (2010)
- 45 Che, C. L. et al., Int J Clin Exp.Pathol. 6 (2013)
- Chen, B. et al., Cancer Lett. 354 (2014a)
- Chen, Q. et al., PLoS.One. 9 (2014b)
- Chen, R. et al., Lab Invest 95 (2015)
- Chen, S. et al., Cancer Epidemiol. 37 (2013a)
- 50 Chen, S. T. et al., Cancer Sci. 102 (2011)
- Chen, Y. L. et al., Int J Surg. 11 (2013b)
- Cheon, D. J. et al., Clin Cancer Res 20 (2014)
- Cheung, H. C. et al., BMC.Genomics 9 (2008)
- Choi, W. I. et al., Cell Physiol Biochem. 23 (2009)
- 55 Chow, S. N. et al., Eur.J Gynaecol.Oncol 31 (2010)
- Cine, N. et al., Oncol Rep. 32 (2014)
- Clement, S. et al., Virchows Arch. 442 (2003)
- Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. 16 (2003a)
- Cohen, C. J. et al., J Immunol 170 (2003b)
- 60 Cohen, S. J. et al., Pancreas 37 (2008)

- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69 (1972)
- Coligan JE et al., (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. 176 (2006)
- Croner, R. S. et al., Int J Cancer 135 (2014)
- 5 Csizar, A. et al., Breast Cancer Res 16 (2014)
- Cucchiarelli, V. et al., Cell Motil.Cytoskeleton 65 (2008)
- Culler, M. D., Horm.Metab Res 43 (2011)
- Delaval, B. et al., Nat Cell Biol. 13 (2011)
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006)
- 10 Denkberg, G. et al., J Immunol 171 (2003)
- Derycke, L. et al., Int J Dev.Biol. 55 (2011)
- Dhup, S. et al., Curr.Pharm.Des 18 (2012)
- Draoui, N. et al., Dis.Model.Mech. 4 (2011)
- Dutton-Regester, K. et al., Genes Chromosomes.Cancer 51 (2012)
- 15 Egloff, A. M. et al., Cancer Res 66 (2006)
- Ellis, M. J. et al., Nature 486 (2012)
- Falk, K. et al., Nature 351 (1991)
- Feng, H. et al., J Clin Invest 124 (2014)
- Fillmore, R. A. et al., Exp.Biol.Med. (Maywood.) 239 (2014)
- 20 Findeis-Hosey, J. J. et al., Biotech.Histochem. 87 (2012)
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98 (2001)
- Franz, M. et al., J Oral Pathol.Med. 39 (2010)
- Fu, Y. et al., Cancer Biol.Ther 5 (2006)
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. 2 (1996)
- 25 Galmarini, C. M. et al., Br.J Cancer 88 (2003)
- Gamez-Pozo, A. et al., PLoS.One. 7 (2012)
- Gao, H. J. et al., J Cancer Res Clin Oncol (2014a)
- Gao, J. et al., PLoS.One. 9 (2014b)
- Gao, Z. H. et al., Histopathology 65 (2014c)
- 30 Gardina, P. J. et al., BMC.Genomics 7 (2006)
- Garg, M. et al., J Clin Endocrinol.Metab 99 (2014)
- Gattinoni, L. et al., Nat Rev.Immunol 6 (2006)
- Geyik, E. et al., Gene 540 (2014)
- Glen, A. et al., Prostate 70 (2010)
- 35 Glymph, S. et al., Infect.Genet.Evol. 16 (2013)
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100 (2003)
- Godkin, A. et al., Int.Immunol 9 (1997)
- Gong, Y. et al., Adv.Anat.Pathol. 21 (2014)
- Gorlov, I. P. et al., Cancer Res 67 (2007)
- 40 Green MR et al., 4th, (2012)
- Greenfield EA, 2nd, (2014)
- Guo, C. et al., Clin Chim.Acta 417 (2013)
- Guo, C. et al., Nat Commun. 6 (2015)
- Gutgemann, A. et al., Arch.Dermatol.Res 293 (2001)
- 45 Hait, W. N. et al., Trans.Am Clin Climatol.Assoc. 117 (2006)
- Han, J. C. et al., World J Surg.Oncol 13 (2015)
- Hao, X. et al., J Membr.Biol. 247 (2014)
- He, X. et al., Neoplasma 61 (2014)
- He, X. et al., Cancer Res 68 (2008)
- 50 Hoffmann, N. E. et al., Cancer 112 (2008)
- Hopker, K. et al., EMBO J 31 (2012a)
- Hopker, K. et al., Cell Cycle 11 (2012b)
- Horibe, T. et al., Chembiochem. 15 (2014)
- Horinouchi, M. et al., Pediatr.Hematol.Oncol 27 (2010)
- 55 Hu, S. et al., J Cancer Res Clin Oncol 140 (2014)
- Hu, W. et al., Cell Death.Dis. 4 (2013)
- Huang, H. C. et al., Technol.Cancer Res Treat. 9 (2010)
- Hurst, J. H. et al., Cell Mol Biol.Lett. 14 (2009)
- Hussey, G. S. et al., Mol Cell 41 (2011)
- 60 Hwang, M. L. et al., J Immunol. 179 (2007)

Hyung, S. W. et al., *Mol Cell Proteomics*. 10 (2011)
 li, M. et al., *Exp.Biol.Med.* (Maywood.) 231 (2006)
 Isfort, R. J. et al., *Oncogene* 15 (1997)
 Ishiwata, T. et al., *Oncol Rep.* 18 (2007)
 5 Izaki, T. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 329 (2005)
 Jacob, M. et al., *Curr.Mol Med.* 12 (2012)
 Jaeger, E. et al., *Nat Genet.* 44 (2012)
 Jain, R. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol Morphol.* 18 (2010)
 Januchowski, R. et al., *Biomed.Res Int* 2014 (2014)
 10 Jeda, A. et al., *Ginekol.Pol.* 85 (2014)
 Jeng, Y. M. et al., *Br.J Surg.* 96 (2009)
 Jeong, H. C. et al., *J Proteome.Res* 10 (2011)
 Jones, A. et al., *EMBO Mol Med.* 5 (2013)
 Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987)
 15 Kamino, H. et al., *Cancer Genet.* 204 (2011)
 Kaneko, K. et al., *Pancreas* 24 (2002)
 Kang, C. Y. et al., *J Gastrointest.Surg.* 18 (2014)
 Kang, G. H. et al., *Lab Invest* 88 (2008)
 Kanzawa, M. et al., *Pathobiology* 80 (2013)
 20 Karagiannis, G. S. et al., *Oncotarget.* 3 (2012)
 Kashyap, M. K. et al., *Cancer Biol.Ther* 8 (2009)
 Kashyap, V. et al., *Mol Oncol* 7 (2013)
 Katada, K. et al., *J Proteomics.* 75 (2012)
 Kevans, D. et al., *Int J Surg.Pathol.* 19 (2011)
 25 Khalaileh, A. et al., *Cancer Res* 73 (2013)
 Khuon, S. et al., *J Cell Sci.* 123 (2010)
 Kibbe AH, rd, (2000)
 Kido, T. et al., *Genes (Basel)* 1 (2010)
 Kim, M. et al., *Mol Cancer Res* 6 (2008)
 30 Kim, S. W. et al., *OMICS.* 15 (2011)
 Kirov, A. et al., *J Cell Biochem.* (2015)
 Kojima, M. et al., *PLoS.One.* 9 (2014)
 Koshikawa, K. et al., *Oncogene* 21 (2002)
 Kraya, A. A. et al., *Autophagy.* 11 (2015)
 35 Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* 5 (2006)
 Kuramitsu, Y. et al., *Anticancer Res* 30 (2010)
 Kuramitsu, Y. et al., *Anticancer Res* 31 (2011)
 Kuroda, N. et al., *Histol.Histopathol.* 20 (2005)
 Kuroda, N. et al., *Pathol.Int* 63 (2013)
 40 Kwon, J. et al., *Int J Oncol* 43 (2013)
 Lahsnig, C. et al., *Oncogene* 28 (2009)
 Lee, C. W. et al., *World J Surg.Oncol* 11 (2013a)
 Lee, H. W. et al., *Clin Cancer Res* 19 (2013b)
 Lee, H. W. et al., *Int J Oncol* 41 (2012)
 45 Lee, K. Y. et al., *J Med.* 35 (2004)
 Lee, M. A. et al., *BMC.Cancer* 14 (2014)
 Leivo, I. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 156 (2005)
 Leygue, E. et al., *Cancer Res* 58 (1998)
 Li, G. H. et al., *Bioinformatics.* 30 (2014)
 50 Li, X. et al., *Clin Cancer Res* 20 (2014)
 Li, X. et al., *PLoS.One.* 8 (2013)
 Li, Y. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 198 (2010)
 Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18 (2012)
 Lieveld, M. et al., *Virchows Arch.* 465 (2014)
 55 Lim, R. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 406 (2011)
 Lim, W. et al., *J Cancer Prev.* 18 (2013)
 Lin, H. C. et al., *J Proteome.Res* 12 (2013a)
 Lin, L. et al., *Oncol Lett.* 6 (2013b)
 Linge, A. et al., *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 53 (2012)
 60 Liu, H. et al., *Carcinogenesis* 34 (2013a)

- Liu, M. et al., *Reprod.Sci.* 20 (2013b)
- Liu, X. F. et al., *Apoptosis.* 14 (2009)
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* 162 (1985)
- Long, Z. W. et al., *Tumour.Biol.* 35 (2014)
- 5 Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993)
- Lu, C. et al., *Dig.Dis.Sci.* 58 (2013a)
- Lu, X. et al., *Cancer Biother.Radiopharm.* 28 (2013b)
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981)
- Lund, R. R. et al., *Proteomics.* 12 (2012)
- 10 Lundblad RL, 3rd, (2004)
- Lung, H. L. et al., *Int.J Cancer* 127 (2010)
- Luo, Y. et al., *Mol Med.Rep.* 9 (2014)
- Lv, T. et al., *PLoS.One.* 7 (2012)
- Manning, T. J., Jr. et al., *Cell Motil.Cytoskeleton* 45 (2000)
- 15 Marg, A. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 401 (2010)
- Matassa, D. S. et al., *Cell Death.Dis.* 4 (2013)
- Matchett, K. B. et al., *Adv.Exp.Med.Biol.* 773 (2014)
- Mazieres, J. et al., *Oncogene* 24 (2005)
- McCluggage, W. G. et al., *Semin.Diagn.Pathol.* 22 (2005)
- 20 McIntyre, J. C. et al., *Nat Med.* 18 (2012)
- Medjkane, S. et al., *Nat Cell Biol.* 11 (2009)
- Meng, F. et al., *Int J Oncol* 43 (2013)
- Menhofer, M. H. et al., *PLoS.One.* 9 (2014)
- Mentlein, R. et al., *Biol.Chem.* 392 (2011)
- 25 Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997)
- Milani, C. et al., *BMC.Cancer* 13 (2013)
- Miyagi, T. et al., *Mol Urol.* 5 (2001)
- Mochizuki, S. et al., *Cancer Sci.* 98 (2007)
- Modlin, I. M. et al., *Aliment.Pharmacol.Ther* 31 (2010)
- 30 Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006)
- Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997)
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12 (2006)
- Mu, Y. et al., *Electrophoresis* 34 (2013)
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* 7 (2008)
- 35 Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* 7 (2007)
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999)
- Mushinski, J. F. et al., *J Biol.Chem.* 284 (2009)
- Nakamura, H. et al., *Curr.Pharm.Des* 19 (2013)
- Nakayama, H. et al., *J Clin Pathol.* 55 (2002)
- 40 Nassar, Z. D. et al., *Oncotarget.* 4 (2013)
- Niedergethmann, M. et al., *Br.J Cancer* 97 (2007)
- Nikolova, D. N. et al., *Oncol Rep.* 20 (2008)
- Nishioka, M. et al., *Oncogene* 19 (2000)
- Olesen, S. H. et al., *Mol Cell Proteomics.* 4 (2005)
- 45 Ou, Y. et al., *Urol.Oncol* 32 (2014)
- Pace, A. et al., *Curr.Pharm.Des* 19 (2013)
- Pan, S. et al., *OMICS.* 13 (2009)
- Panico, F. et al., *Adv.Cancer Res* 105 (2009)
- Patel, R. A. et al., *Cancer Res* 72 (2012)
- 50 Pereira, P. M. et al., *Org.Biomol.Chem.* 12 (2014)
- Pinheiro J et al., (2015)
- Pitule, P. et al., *Anticancer Res* 33 (2013)
- Pivonello, C. et al., *Infect.Agent.Cancer* 9 (2014)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995)
- 55 Pontisso, P., *Ann Hepatol.* 13 (2014)
- Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994)
- Portela-Gomes, G. M. et al., *Regul.Pept.* 146 (2008)
- Qi, Y. et al., *Proteomics.* 5 (2005)
- Qu, Z. et al., *Cancer Med.* 3 (2014)
- 60 Quinn, M. C. et al., *Int J Oncol* 42 (2013)

- Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics 50 (1999)
- Reddy, S. P. et al., Clin Cancer Res 14 (2008)
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18 (2002)
- Rehman, I. et al., PLoS.One. 7 (2012)
- 5 Rini, B. I. et al., Cancer 107 (2006)
- Robinson, T. J. et al., Cell Cycle 12 (2013)
- Rock, K. L. et al., Science 249 (1990)
- Roman-Gomez, J. et al., Blood 109 (2007)
- Roustit, M. M. et al., J Endocrinol. 223 (2014)
- 10 Roy, D. et al., Blood 118 (2011)
- Rucki, A. A. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014)
- S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 032-010OL, (2013)
- Saiki, R. K. et al., Science 239 (1988)
- Salman, B. et al., Oncoimmunology. 2 (2013)
- 15 Sato, Y. et al., J Cell Sci. 126 (2013)
- Savoy, R. M. et al., Endocr.Relat Cancer 20 (2013)
- Schlomann, U. et al., Nat Commun. 6 (2015)
- Schroder, W. A. et al., Cancer Med. 3 (2014)
- Schulte, J. et al., Histochem.Cell Biol. 138 (2012)
- 20 Scrideli, C. A. et al., J Neurooncol. 88 (2008)
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics 49 (1999)
- Seya, T. et al., Oncol Rep. 16 (2006)
- Sherman F et al., (1986)
- Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell 3 (2003)
- 25 Simiczjew, A. et al., Histochem.Cell Biol. 142 (2014)
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004)
- Skondra, M. et al., Anticancer Res 34 (2014)
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. 24 (2006)
- Smith, M. J. et al., Br.J Cancer 100 (2009)
- 30 Song, B. L. et al., Biochem.J 394 (2006)
- Song, Q. et al., Tumour.Biol. 35 (2014)
- Sood, A. K., Immunol Res 46 (2010)
- Souчек, J. J. et al., Br.J Cancer 111 (2014)
- Stolk, J. A. et al., Prostate 60 (2004)
- 35 Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. 9 (2008)
- Sun, D. W. et al., Cancer Epidemiol. (2015a)
- Sun, J. et al., J Mol Histol. 46 (2015b)
- Sun, Z. et al., J Proteome.Res 13 (2014)
- Suzuki, H. et al., Int J Oncol 12 (1998)
- 40 Szarvas, T. et al., Int J Cancer 135 (2014)
- Takahashi, K. et al., Peptides 27 (2006)
- Takeuchi, A. et al., Mol Cell Endocrinol. 384 (2014)
- Tatenhorst, L. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. 63 (2004)
- Terabayashi, T. et al., PLoS.One. 7 (2012)
- 45 Terada, T. et al., J Hepatol. 24 (1996)
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. 62 (2005)
- Thorsen, K. et al., Mol Cell Proteomics. 7 (2008)
- Tran, E. et al., Science 344 (2014)
- Trougakos, I. P., Gerontology 59 (2013)
- 50 Tummala, R. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. 64 (2009)
- Unger, K. et al., Endocr.Relat Cancer 17 (2010)
- Untergasser, G. et al., Mech.Ageing Dev. 126 (2005)
- Vassar, R. et al., J Neurochem. 130 (2014)
- Von Hoff, D. D. et al., N.Engl.J Med. 369 (2013)
- 55 Vui-Kee, K. et al., Kaohsiung.J Med.Sci. 28 (2012)
- Walker, E. J. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014)
- Walter, S. et al., J Immunol 171 (2003)
- Walter, S. et al., Nat Med. 18 (2012)
- Wang, G. H. et al., Oncol Lett. 5 (2013a)
- 60 Wang, H. et al., Front Oncol 4 (2014a)

- Wang, J. et al., J Exp.Clin Cancer Res 34 (2015)
- Wang, Q. et al., PLoS.One. 8 (2013b)
- Wang, X. et al., Urol.Int. 92 (2014b)
- Wang, X. Y. et al., Int J Hyperthermia 29 (2013)
- 5 Watson, M. B. et al., Acta Oncol 46 (2007)
- Watt, H. L. et al., Mol Cell Endocrinol. 286 (2008)
- Weber, A. M. et al., Pharmacol.Ther (2014)
- Wikberg, M. L. et al., Tumour.Biol. 34 (2013)
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. 8 (1999)
- 10 Williams, S. et al., PLoS.One. 8 (2013)
- Wong, C. C. et al., Nat Genet. 46 (2014)
- World Cancer Report, (2014)
- Xia, Z. K. et al., Dis.Esophagus. 25 (2012)
- Xie, X. et al., Oncol Lett. 7 (2014)
- 15 Xiong, D. et al., Carcinogenesis 33 (2012)
- Xu, C. Z. et al., Int J Clin Exp.Pathol. 6 (2013)
- Yang, C. Y. et al., J Immunol 192 (2014a)
- Yang, H. et al., PLoS.One. 9 (2014b)
- Yang, S. et al., Biochim.Biophys.Acta 1772 (2007)
- 20 Yasui, W. et al., Cancer Sci. 95 (2004)
- Yeung, T. L. et al., Cancer Res 73 (2013)
- Yu, X. et al., Cancer Res 73 (2013)
- Yuan, B. et al., Immunobiology 217 (2012)
- Yuan, D. et al., J Surg.Oncol 108 (2013)
- 25 Yuan, R. H. et al., Ann Surg.Oncol 16 (2009)
- Zanaruddin, S. N. et al., Hum.Pathol. 44 (2013)
- Zaravinos, A. et al., PLoS.One. 6 (2011)
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. 57 (1997)
- Zhang, C. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 434 (2013)
- 30 Zhang, C. C. et al., Cancer Res 59 (1999)
- Zhang, Y. et al., Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi. 14 (2006)
- Zhang, Y. et al., Cancer Lett. 303 (2011)
- Zhao, D. et al., J Neurooncol. 118 (2014)
- Zhao, Z. K. et al., Tumour.Biol. 34 (2013)
- 35 Zhu, H. H. et al., Asian Pac.J Trop.Med. 7 (2014)
- Zocchi, M. R. et al., Blood 119 (2012)
- Zou, T. T. et al., Oncogene 21 (2002)

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Immatics biotechnologies GmbH

<120> Нові пептиди та комбінації пептидів для застосування для імунотерапії раку підшлункової залози та інших видів раку

<130> I32744wo

<150> GB 1504502.4
<151> 2015-03-17

<150> US 62/134,253
<151> 2015-03-17

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Leu Ala Gln Gln Glu Ser Glu Ile
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Leu Gln Glu Glu His Val Ala Val Ala
1 5 10

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Leu Leu Thr Phe Met Glu Gln Val
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val
1 5

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Leu Val Asp Asp Ser Phe Leu His Thr Val
1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Val Leu Ile Ser Leu Lys Gln Ala Pro Leu Val
 1 5 10

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Gln Gln Glu Ser Glu Ile Ala Gly Ile
 1 5 10

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Val Asp Asp Leu Thr Ile Asn Leu
 1 5

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val
 1 5 10

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Phe Leu Val Asp Gly Ser Ser Ala Leu
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Phe Leu Tyr Lys Ile Ile Asp Glu Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Phe Val Ser Glu Ile Val Asp Thr Val
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Leu Ala Gly Gln Thr Tyr His Val
1 5

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Val Leu Ala Lys Pro Gly Val Ile Ser Val
1 5 10

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser Val
1 5

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Pro Val Asn Val Thr Thr Glu Val Lys Ser Val
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Phe Leu Lys Ser Gly Asp Ala Ala Ile Val
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Leu Leu Asp Asp Glu Leu Met Ser Leu
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

His Leu Ala Pro Glu Thr Asp Glu Asp Asp Leu
1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Leu Ala Gly Asp Gly Val Gly Ala Val
1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

His Leu Met Asp Gln Pro Leu Ser Val
1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Leu Asp Gly Ala Ala Val Asn Gln Val
1 5 10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Leu Ser Ala Phe Thr Leu Phe Leu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val
1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Leu Lys Glu Glu Val Gly Glu Glu Ala Ile
1 5 10

<210> 26

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Leu Lys Glu Glu Val Gly Glu Glu Ala Ile Val
 1 5 10

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Tyr Leu Gln Gly Gln Arg Leu Asp Asn Val
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Tyr Leu Gln Gly Gln Arg Leu Asp Asn Val Val
 1 5 10

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Phe Leu Gln Glu Tyr Leu Asp Ala Ile
 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Val Val Asp Glu Gly Pro Thr Gly Val
 1 5

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Ser Leu Ala Ala Ala Ala Gly Lys Gln Glu Leu
 1 5 10

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Ser Leu Ala Ala Ala Ala Gly Lys Gln Glu Leu Ala
 1 5 10

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Leu Asp Ser Arg Leu Glu Leu Ala
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Met Leu Met Pro Val His Phe Leu Leu
 1 5

<210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Val Met Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr His Thr Val
 1 5 10

<210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser Ile Val His
 1 5 10

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Gly Leu Leu Lys Lys Ile Asn Ser Val
 1 5

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Asn Leu Val Glu Lys Thr Pro Ala Leu Val
 1 5 10

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Thr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Glu Ala
1 5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Phe Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr Thr Leu
1 5 10

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Glu Gly Val
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Lys Leu Val Asp Lys Ser Thr Glu Leu
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Arg Leu Asp Gln Arg Val Pro Gln Ile
1 5

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Val Leu Leu Asp Lys Ile Lys Asn Leu Gln Val
1 5 10

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val
1 5

<210> 46
<211> 14
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Thr Phe Ala Pro Val Asn Val Thr Thr Glu Val Lys Ser Val
1 5 10

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Lys Met Asp Ala Ser Leu Gly Asn Leu Phe Ala
1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ala Leu Thr Gln Thr Gly Gly Pro His Val
1 5 10

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ala Leu Ala Ala Ile Leu Thr Arg Leu
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu
1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Met Val Glu Glu Ile Gly Val Glu Leu
1 5 10

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Ser Ser Phe Gly Gly Leu Gly Gly Gly Ser Val
 1 5 10

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Val Leu Leu Ser Glu Ile Glu Val Ala
 1 5

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Tyr Leu Asp Ala Met Met Asn Glu Ala
 1 5

<210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Gly Ala Ile Gly Ser Val
 1 5 10

<210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Phe Leu Gly Lys Val Val Ile Asp Val
 1 5

<210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Leu Ala Ala Phe Lys Ala Phe Leu
 1 5

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Lys Leu Phe Asn Leu Ser Lys Glu Asp Asp Val

1 5 10

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Tyr Leu Glu Glu Asp Val Tyr Gln Leu
 1 5

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Leu Glu Lys Asp Tyr Glu Glu Val Gly Val
 1 5 10

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Ala Leu Glu Lys Asp Tyr Glu Glu Val
 1 5

<210> 63
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg
 1 5

<210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

Phe Leu Val Ser Asn Met Leu Leu Ala Glu Ala
 1 5 10

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65

Tyr Leu Tyr Asp Ser Glu Thr Lys Asn Ala
 1 5 10

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66

Ala Leu Leu Ser Gly Leu Arg Glu Ala
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Lys Met Phe Phe Leu Ile Asp Lys Val
1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Val Met Ala Pro Phe Thr Met Thr Ile
1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val
1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Arg Leu Asp Asp Leu Lys Met Thr Val
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Arg Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Gly Leu Thr Asp Asn Ile His Leu Val
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Leu Ser Ser Ile Lys Val Glu Val
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala
1 5

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

Thr Leu Tyr Pro His Thr Ser Gln Val
 1 5

<210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val
 1 5

<210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82

Ser Ile Ser Asp Val Ile Ala Gln Val
 1 5

<210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83

Phe Leu Ile Asp Ser Ser Glu Gly Val
 1 5

<210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

Asn Leu Leu Asp Leu Asp Tyr Glu Leu
 1 5

<210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85

Thr Val Ala Glu Val Ile Gln Ser Val
 1 5

<210> 86
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu
1 5 10

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 87

Leu Leu Leu Gly Ser Pro Ala Ala Ala
1 5

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 88

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 89

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Пептид, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21, або його фармацевтично прийнятна сіль, причому згаданий пептид здатний зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I класу.
2. Нуклеїнова кислота, що кодує пептид за п. 1.
- 10 3. Нуклеїнова кислота за п. 2, яка зв'язана з гетерологічною послідовністю промотору, або вектор експресії, здатний експресувати вказану нуклеїнову кислоту.
4. Рекombінантна клітина-хазяїн, що містить пептид за п. 1 або нуклеїнову кислоту або вектор експресії за п. 2 або п. 3.
5. Рекombінантна клітина-хазяїн за п. 4, яка є антигенпрезентуючою клітиною, переважно дендритною клітиною.
- 15 6. Спосіб отримання пептиду за п. 1, де спосіб включає культивування клітини-хазяїна за п. 4 або п. 5, яка презентує пептид за п. 1, і виділення пептиду з клітини-хазяїна або її культурального середовища.
7. Активована Т-клітина, одержана способом, який включає контактування Т-клітин *in vitro* з навантаженими антигенами молекулами МНС людини I або II класу, експресованими на поверхні придатної антигенпрезентуючої клітини, протягом періоду часу, достатнього для активації згаданих Т-клітин шляхом набуття ними специфічності до антигену, де згаданий антиген є пептидом відповідно до п. 1, який селективно розпізнає клітину, що презентує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, визначену в п. 1.
- 20

8. Застосування пептиду за п. 1, нуклеїнової кислоти або вектору експресії за п. 2 або п. 3, клітини за п. 4 або п. 5, або активованої Т-клітини за п. 7 у діагностиці раку, де згаданий рак вибраний з групи, що включає рак підшлункової залози, рак легенів, рак нирки, рак головного мозку, рак товстої кишки, рак прямої кишки, рак стравоходу, рак молочної залози, рак яєчника, рак шлунка, рак печінки, рак передміхурової залози, меланому, лейкоз і інші пухлини, які виявляють надмірну експресію білка LAMC2, з якого походить пептид з послідовністю SEQ ID NO: 21.

9. Застосування пептиду за п. 1, нуклеїнової кислоти або вектору експресії за п. 2 або п. 3, клітини за п. 4 або п. 5, або активованої Т-клітини за п. 7 у лікуванні раку, де згаданий рак вибраний з групи, що включає рак підшлункової залози, рак легенів, рак нирки, рак головного мозку, рак товстої кишки, рак прямої кишки, рак стравоходу, рак молочної залози, рак яєчника, рак шлунка, рак печінки, рак передміхурової залози, меланому, лейкоз і інші пухлини, які виявляють надмірну експресію білка LAMC2, з якого походить пептид з послідовністю SEQ ID NO: 21.

10. Застосування пептиду за п. 1, нуклеїнової кислоти або вектору експресії за п. 2 або п. 3, клітини за п. 4 або п. 5, або активованої Т-клітини за п. 7 у виробництві лікарського засобу проти раку, де згаданий рак вибраний з групи, що включає рак підшлункової залози, рак легенів, рак нирки, рак головного мозку, рак товстої кишки, рак прямої кишки, рак стравоходу, рак молочної залози, рак яєчника, рак шлунка, рак печінки, рак передміхурової залози, меланому, лейкоз і інші пухлини, які виявляють надмірну експресію білка LAMC2, з якого походить пептид з послідовністю SEQ ID NO: 21.

11. Терапевтичний комплект, що містить контейнер, який містить фармацевтичну композицію, що містить пептид за п. 1, нуклеїнову(і) кислоту(и) або вектор(и) експресії за п. 2 або п. 3, клітину(и) за п. 4 або п. 5, або активовану Т-клітину за п. 7 у розчині або у ліофілізованій формі.

12. Комплект за п. 11, який додатково містить другий контейнер, що містить розріджувач або розчин для відновлення ліофілізованої композиції.

13. Комплект за будь-яким з пп. 11-12, який додатково містить інструкції із (i) застосування розчину або (ii) відновлення і/або застосування ліофілізованої композиції.

14. Комплект за будь-яким з пп. 11-13, який додатково містить один або більше з (iii) буферу, (iv) розріджувача, (v) фільтра, (vi) голки або (vii) шприца.

15. Фармацевтична композиція, що містить принаймні один активний інгредієнт, вибраний з групи, що складається з:

а) пептиду з послідовністю SEQ ID NO: 21;

б) нуклеїнової кислоти, що кодує а), або вектору експресії, що містить згадану нуклеїнову кислоту,

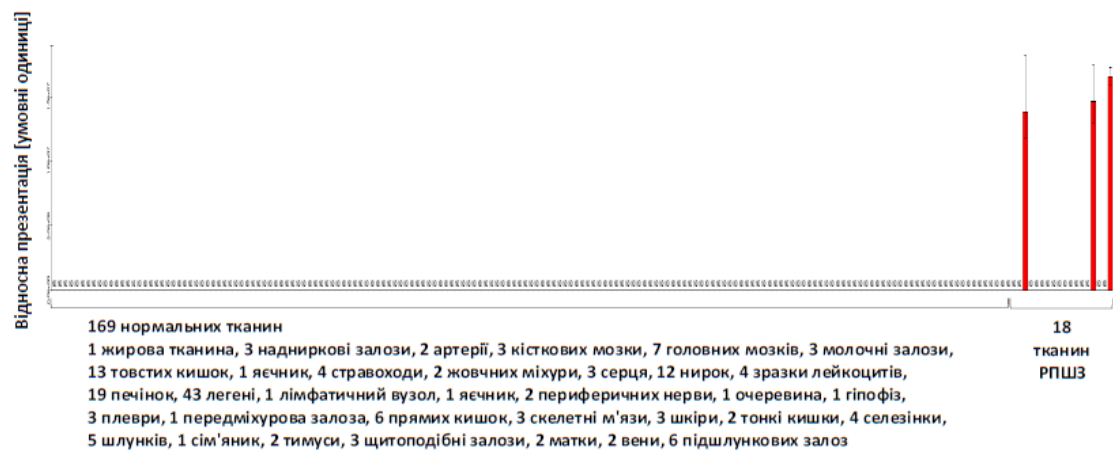
в) клітини-хазяїна, що містить вектор експресії за б),

г) активованої Т-клітини, отриманої згідно зі способом, що включає контактування Т-клітин *in vitro* з пептидом за а), експресованим на поверхні відповідної антигенпрезентуючої клітини протягом періоду часу, достатнього для активації згаданої Т-клітини шляхом набуття нею специфічності до антигену, а також способу перенесення цих активованих Т-клітин в організми аутологічних або інших пацієнтів;

і фармацевтично прийнятний носій.

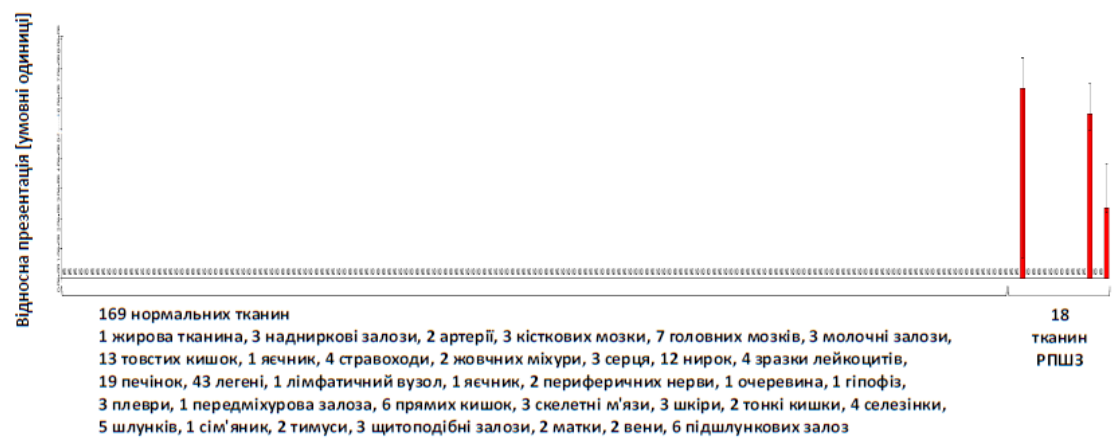
16. Фармацевтична композиція за п. 15, яка додатково містить фармацевтично прийнятну допоміжну речовину і/або стабілізатор.

Пептид: FLAQQESEI (A*02) SEQ ID NO: 1



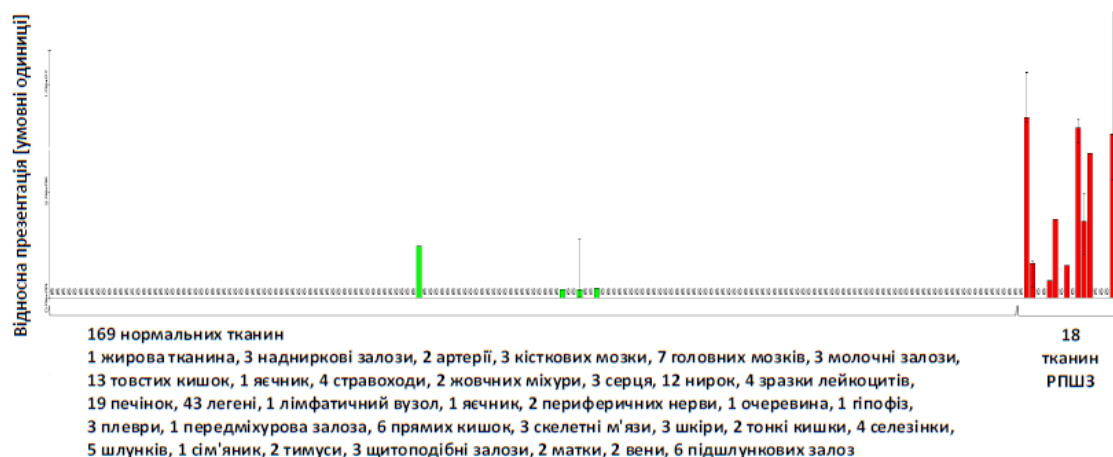
Фіг. 1А

Пептид: SLQEEHVAVA (A*02) SEQ ID NO: 2



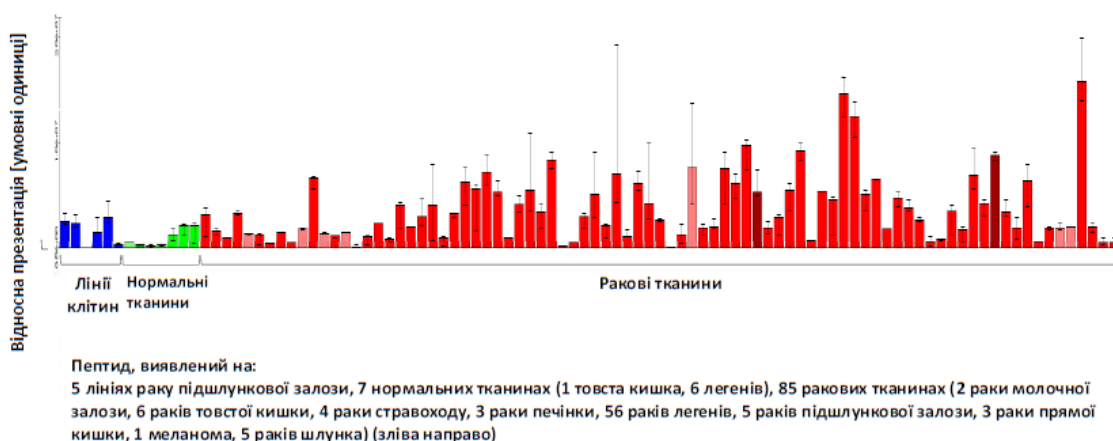
Фіг. 1В

Пептид: FLVDGSSAL (A*02) SEQ ID NO: 10



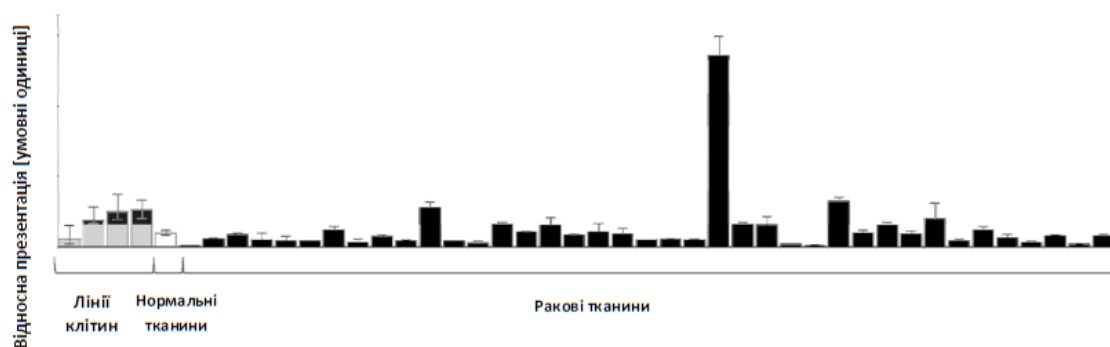
Фіг. 1C

Пептид: FLFDGSSANLV (A*02) SEQ ID NO: 9



Фіг. 1D

Пептид: SVDVSPPKV (A*02)
SEQ ID NO: 4

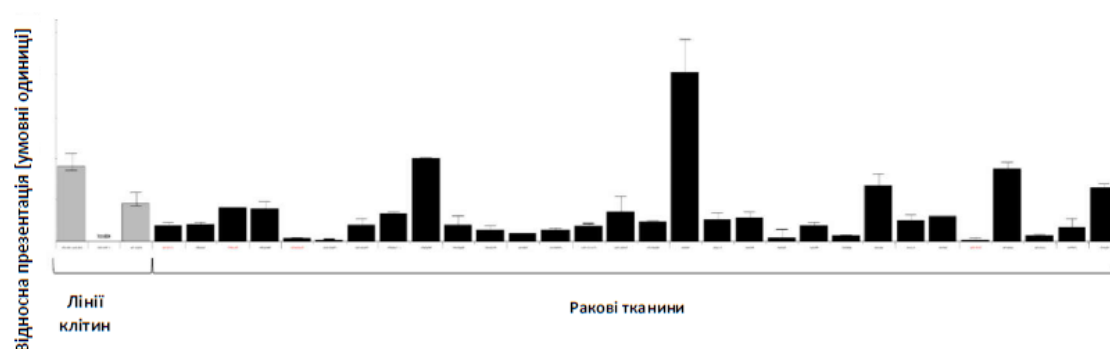


Пептид, виявлений на:

1 лінії клітин, 3 первинних культурах, 1 шкірі, 1 раку жовчних протоків, 3 раках головного мозку, 1 раку молочної залози, 4 раках стравоходу, 5 раках нирки, 11 раках легенів, 1 раку лімфатичного вузла, 1 раку яєчника, 3 раках підшлункової залози, 1 раку передміхурової залози, 3 раках шкіри, 2 раках сечового міхура, 3 раках матки (зліва направо)

Фіг. 1E

Пептид: LLVDDSLHTV (A*02)
SEQ ID NO: 5

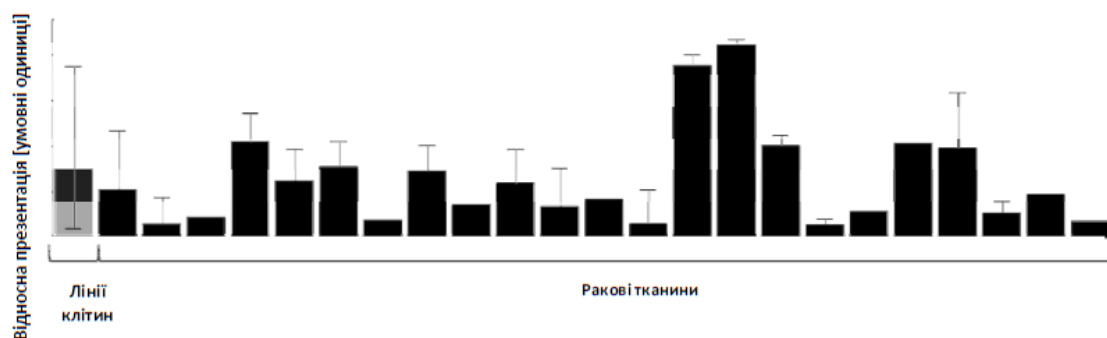


Пептид, виявлений на:

2 лініях клітин, 1 первинній культурі, 1 раку жовчних протоків, 2 раках головного мозку, 1 раку молочної залози, 3 раках стравоходу, 2 раках жовчного міхура, 2 раках нирки, 2 раках печінки, 3 раках легенів, 7 раках яєчника, 2 раках підшлункової залози, 3 раках шкіри, 1 раку шлунка, 1 раку матки, (зліва направо)

Фіг. 1F

Пептид: IVDDLTINL (A*02)
SEQ ID NO: 8

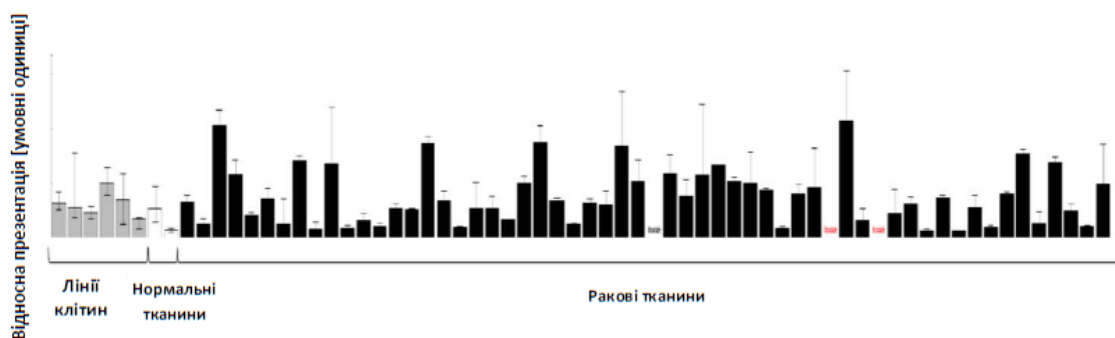


Пептид, виявлений на:

1 лінії клітин, 1 раку товстої кишки, 2 раках стравоходу, 2 раках жовчного міхура, 5 раках легенів, 1 раку лімфатичного вузла, 1 раку підшлункової залози, 2 раках шкіри, 4 раках шлунка, 1 раку сечового міхура, 4 раках матки (зліва направо)

Фіг. 1G

Пептид: LLAGQTYHV (A*02)
SEQ ID NO: 13

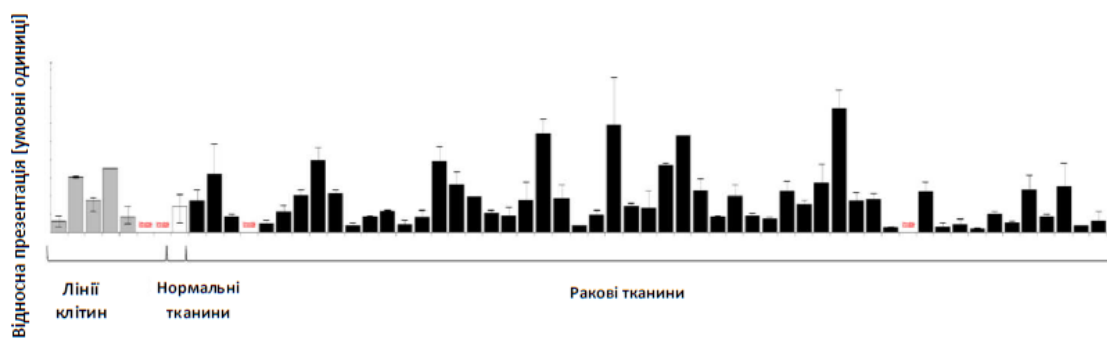


Пептид, виявлений на:

6 лініях клітин, 1 легені, 1 плаценті, 2 раках жовчних протоків, 3 раках молочної залози, 2 раках стравоходу, 2 раках жовчного міхура, 1 раку печінки, 36 раках легенів, 3 раках яєчника, 3 раках підшлункової залози, 1 раку прямої кишки, 3 раках сечового міхура (зліва направо)

Фіг. 1H

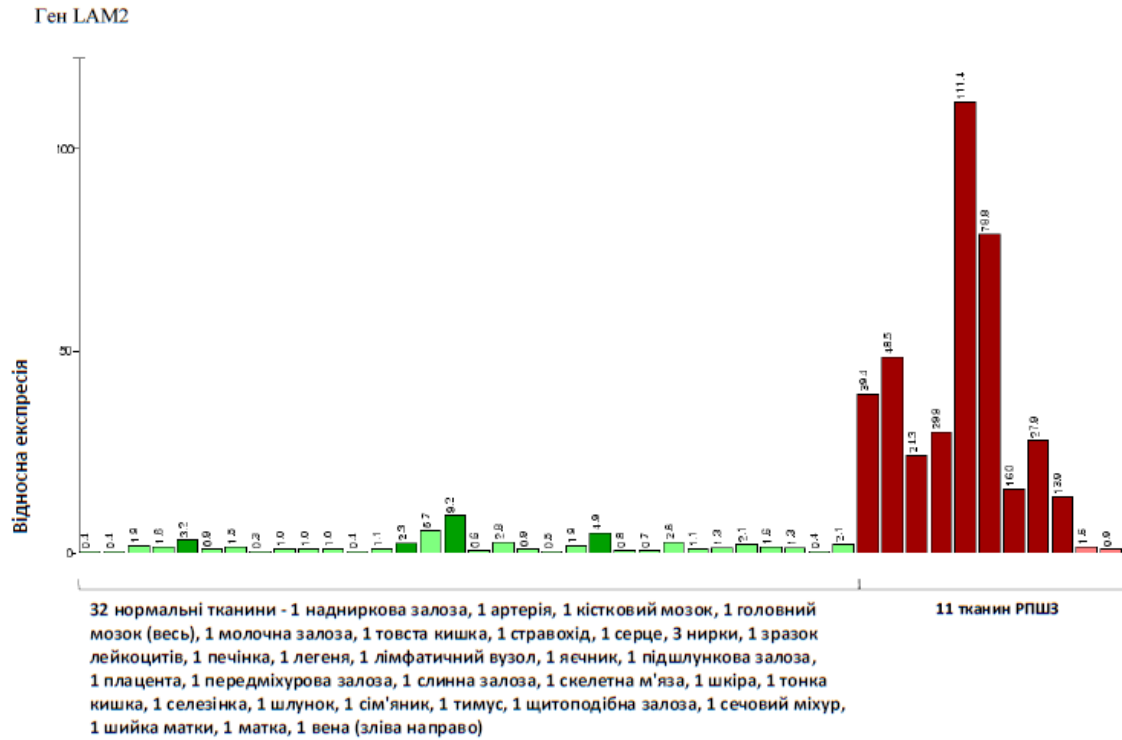
Пептид: VLAKPGVISV (A*02)
SEQ ID NO: 14



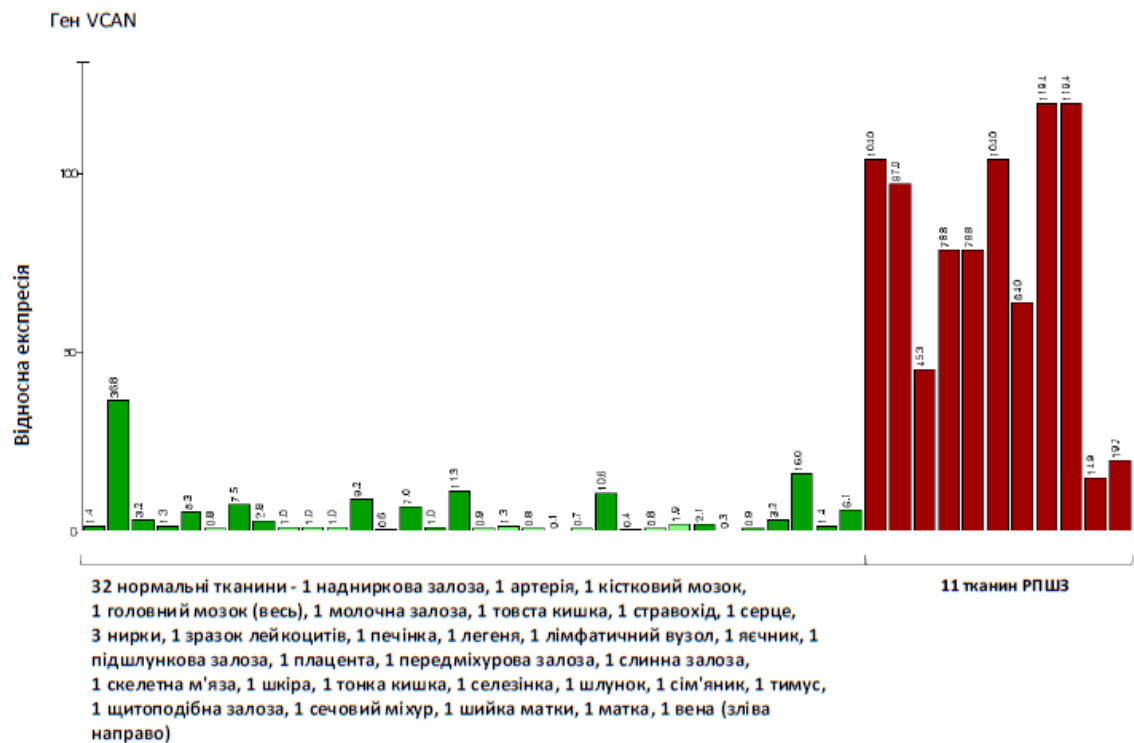
Пептид, виявлений на:

7 лініях клітин, 1 легені, 1 раку жовчних протоків, 4 раках молочної залози, 1 раку товстої кишки, 2 раках стравоходу, 1 раку жовчного міхура, 36 раках легенів, 1 раку яєчника, 3 раках підшлункової залози, 2 раках прямої кишки, 1 раку шлунка, 1 раку сечового міхура (зліва направо)

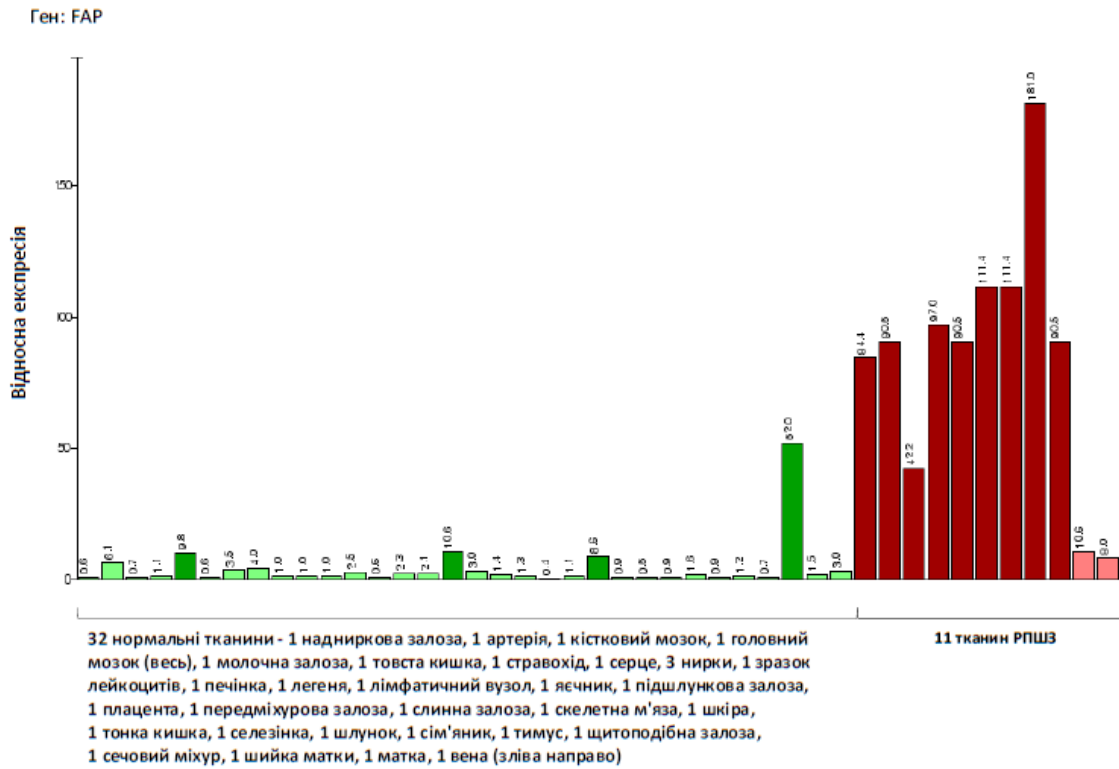
Фіг. 1I



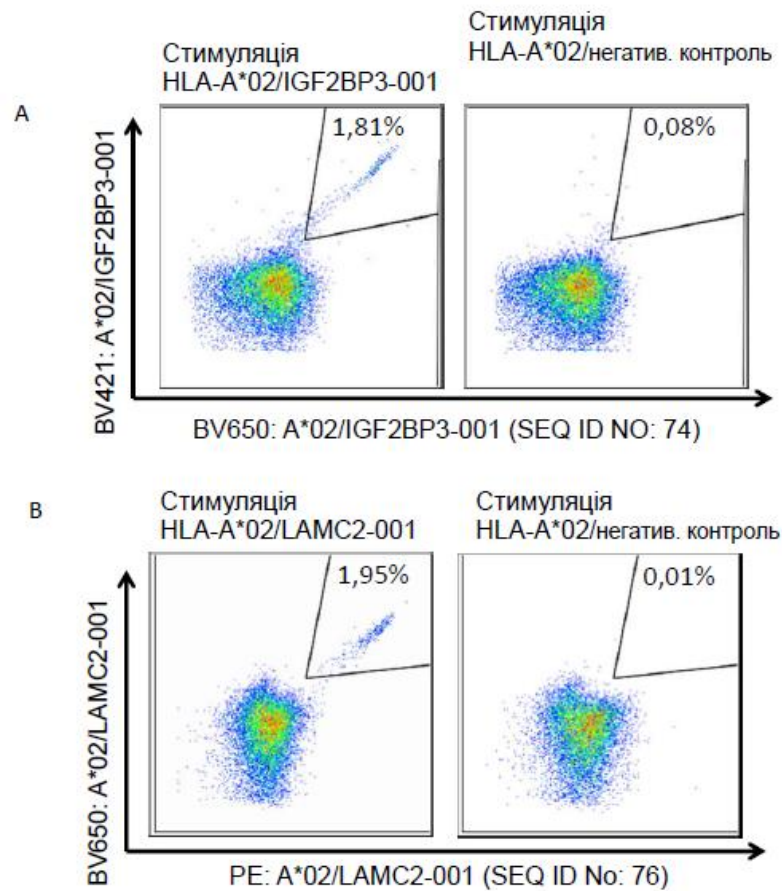
Фіг. 2А



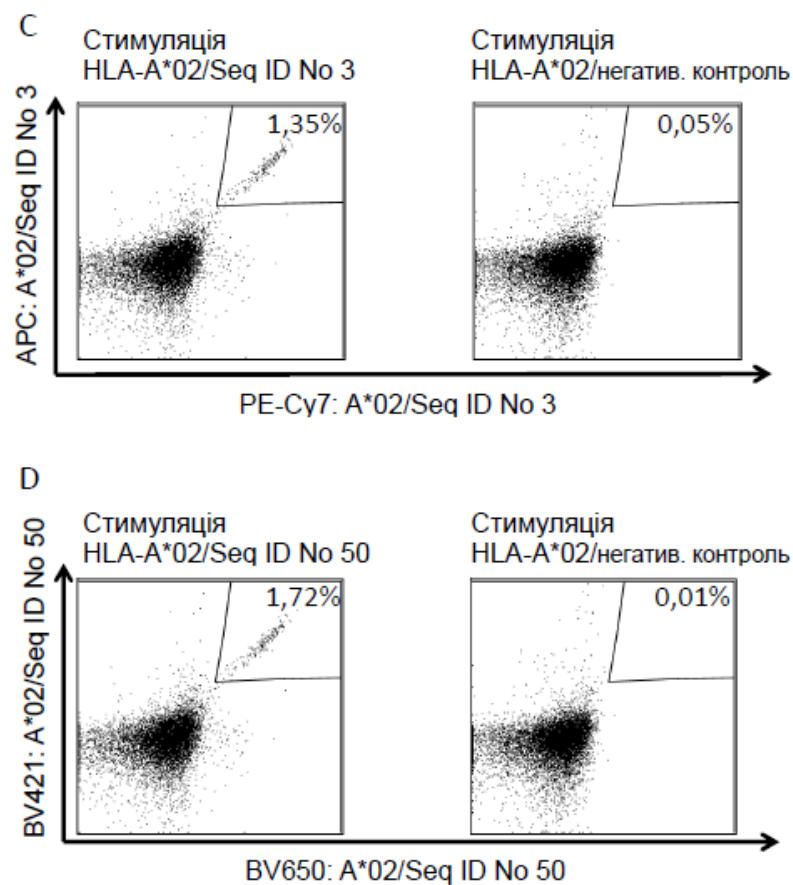
Фіг. 2В



Фіг. 2С



Фіг. 3



Фіг. 3 (продовж.)