



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111952** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 05366	(72) Винахідник(и):	Вайншенк Тоні (DE), Зінгх Харпреет (DE), Фрітше Йенс (DE), Мар Андреа (DE)
(22) Дата подання заявки:	22.11.2011	(73) Власник(и):	ІММАТІКС БІОТЕКНОЛОДЖІС ГМБХ, Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tübingen, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.07.2016	(74) Представник:	Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/416,981, 1021289.2, 61/423,652	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Cornforth A.N. et al.: "Increases in serum TARC/CCL17 levels are associated with progression-free survival in advanced melanoma patients in response to dendritic cell-based immunotherapy", J. Clin. immunol., vol. 29, no. 5, 2009, pages 657-664 Maruyama R. et al.: "Absence of Bcl-2 and Fas/CD95/APO-1 predicts the response to immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma", Brit. J. Cancer, vol. 95, no. 9, 6 November 2006, pages 1244-1249 US2010240546 A1, 23.09.2010.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	24.11.2010, 15.12.2010, 16.12.2010		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, GB, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.08.2013, Бюл.№ 15		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.07.2016, Бюл.№ 13		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2011/070661, 22.11.2011		

(54) БІОМАРКЕР ДЛЯ ПЕРЕДБАЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТУ ПРОТИРАКОВОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу передбачення ефективності протиракової імунотерапії у пацієнта на базі біомаркера Аполіпопротеїну А1 (АроА1).

UA 111952 C2

Цей винахід стосується методів передбачення ефекту від протиракової імунотерапії у пацієнта за допомогою нових біомаркерів. Цей винахід також стосується прогнозу результату лікування на базі згаданих біомаркерів. Цей винахід також стосується наборів біомаркерів для використання у вищезгаданих методах

Отже, за цією заявкою на винахід заявляється пріоритет заявки GB1021289.6, поданої 15 грудня 2010 р., заявки US 61/416,981, поданої 24 листопада 2010 р., та US 61/423,652, поданої 16 грудня 2010 р. Ця заявка включає перелік 50 послідовностей. Для цілей цього винаходу всі цитовані джерела включені в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

Передумова створення винаходу

Стимуляція імунної відповіді залежить від присутності антигенів, що сприймаються імунною системою хазяїна як чужорідні. Відкриття існування пухлино-асоційованих та пухлино-специфічних антигенів збільшує можливість 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.

Певні елементи клітинної ланки імунної системи здатні специфічно розпізнавати та знищувати пухлинні клітини. Виділення цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) із популяції пухлино-інфільтруючих клітин або з периферичної крові дозволяє припустити, що такі клітини відіграють важливу роль у природному імунному захисті від раку (Cheever et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1993 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; *J Immunol.* 1999, 162(2):989-94). Важливу роль у цій відповіді відіграють, зокрема, CD8-позитивні Т-клітини (CD8⁺), які розпізнають комплекси, що утворені молекулами головного комплексу гістосумісності I класу (MHC) та пептидами. Ці пептиди зазвичай складаються з 8-10 амінокислотних залишків, що отримані з цитозольних білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP) (Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. *Nature* 2000; 404(6779):770-774). Молекули MHC людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

Існує два класи молекул MHC. Молекули MHC I класу можна виявити в більшості клітин, що мають ядра, ці молекули презентують пептиди, які утворюються в результаті протеолітичного розщеплення ендогенних білків, продуктів DRIP та великих за розміром пептидів. Молекули MHC II класу містяться головним чином на професійних антиген-презентуючих клітинах (АПК) і презентують пептиди екзогенних білків, які поглинаються клітинами АПК і згодом процесуються (Cresswell P. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:259-93). Комплекси пептидів і молекул MHC I класу розпізнаються CD8-позитивними цитотоксичними Т-лімфоцитами, що несуть відповідний Т-клітинний рецептор (ТКР), в той час як комплекси пептиду і молекул MHC II класу розпізнаються CD4-позитивними Т-хелперами, що несуть відповідний ТКР. Загальновідомо, що ТКР, пептид і MHC, таким чином, є присутніми у стехіометричних кількостях у співвідношенні 1:1:1.

Щоби пептид викликав клітинну імунну відповідь, він має зв'язатися з молекулою MHC. Цей процес залежить від алеля молекули MHC і від амінокислотної послідовності пептиду. Пептиди, що зв'язують молекули MHC I класу, зазвичай мають довжину 8, 9 або 10 амінокислотних залишків і містять консервативні залишки («якорі») у своїх послідовностях, які взаємодіють з відповідною зв'язувальною щілиною молекули MHC. Таким чином, кожний алель MHC має «зв'язувальний мотив», що визначає, які пептиди зможуть специфічно зв'язатися зі зв'язувальною щілиною (Rammensee H. G., Bachmann J. and Stevanovic, S; *MHC Ligands and Peptide Motifs*, Chapman & Hall 1998). Щоби викликати імунну реакцію, пептиди не тільки мають бути здатними зв'язатися з певними молекулами MHC, але вони також мають розпізнаватися Т-клітинами, що несуть специфічні Т-клітинні рецептори (ТКР). Іншою передумовою ефективних імунних реакцій є відсутність імунологічної толерантності до цього антигену.

Пухлино-асоційовані антигени (ТАА), частиною яких є епітопи, що розпізнаються ЦТЛ, можуть бути молекулами білків будь-якого класу, такими як ферменти, рецептори, фактори транскрипції тощо, які експресуються на високому рівні у клітинах відповідної пухлини. Крім того, антигени можуть бути пухлино-специфічними, тобто унікальними для пухлинних клітин, наприклад, такі як продукти мутованих генів, або з альтернативних відкритих рамок читування (BP3), або білкового сплайсингу (Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ. *Science* 2004 Apr 23; 304 (5670):587-90). Іншим важливим класом антигенів є тканино-специфічні антигени, такі як СТ («раково-тестикулярні»)-антигени, які експресуються у різних видах пухлин і у здорових тканинах яєчок.

Таким чином, ТАА є стартовою точкою для розробки протипухлинних вакцин. Методи ідентифікації і визначення характеристик ТАА базуються, наприклад, на використанні ЦТЛ, 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 (Lemmel C., Weik S., Eberle U., Dengjel J., Kratt T., Becker H. D.,

Rammensee H. G., Stevanovic S. Nat. Biotechnol. 2004 Apr.; 22(4):450-4, T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. Cancer Res. 62 (20):5818-5827, 2002).

Однак ідентифікація генів, що надмірно експресовані або селективно експресовані в тканинах пухлин або в лініях клітин пухлин людини, не надає достатньої інформації щодо того, чи є відповідний антиген корисним як мішень для імунотерапії з використанням Т-клітин. Це пов'язано з тим, що лише певна субпопуляція епітопів цих антигенів а) презентується і b) розпізнається Т-клітинами з відповідними ТКР. Крім цього, імунологічна толерантність для саме цього епітопу має бути відсутньою або незначною. Тому важливо вибрати тільки такі пептиди з тих, що належать до надмірно експресованих або селективно експресованих білків, які презентуються в сполученні з молекулами МНС і яких можуть бути мішенями для функціональних Т-клітин. Функціональна Т-клітина визначається як Т-клітина, яка при стимуляції конкретним антигеном може бути клонована і здатна виконувати ефекторні функції («ефекторна Т-клітина»).

Т-хелперні клітини відіграють важливу роль в регуляції ефекторної функції ЦТЛ у протипухлинному імунітеті. Епітопи Т-хелперів, які запускають реакцію цих клітин типу T_H1 , підтримують ефекторні функції CD8-позитивних ЦТЛ, котрі включають цитотоксичні функції, спрямовані проти клітин пухлини, що експресують комплекси пухлино-асоційованого пептиду/МНС на поверхнях своїх клітин. У такий спосіб пухлино-асоційовані епітопи Т-клітин-хелперів, самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованими пептидами, можуть служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні відповіді.

Оскільки обидва типи відповіді, залежні від CD8 та CD4, спільно та синергічно роблять свій внесок у протипухлинну дію, то ідентифікація та визначення характеристик пухлино-асоційованих антигенів, які розпізнаються CD8-позитивними ЦТЛ (ліганд: молекула МНС I класу + пептидний епітоп), так само як і ТАА, які розпізнаються CD4-позитивними Т-хелперами (ліганд: молекула МНС II класу + пептидний епітоп), є важливими для розробки ефективних протипухлинних вакцин і ефективних методів лікування з використанням цих вакцин.

У Європі нирково-клітинна карцинома (НKK) займає сьоме місце серед найбільш поширених злоякісних захворювань у чоловіків, серед яких щорічно реєструється 29 600 нових випадків (3,5% від усіх видів раку). Серед жінок НKK займає дванадцяте місце, 16 700 випадків щорічно (2,3% від усіх видів раку). НKK рідко спостерігається у віці до 40 років, а після цього віку вона удвічі частіше вражає чоловіків, ніж жінок. Захворюваність з віком швидко зростає від менш ніж 2 випадків на 100 000/рік серед пацієнтів молодше 40 років до 38 на 100 000/рік у віковій групі 65–69 років. Після цього віку захворюваність зростає до 46 випадків на 100 000/рік у віковій групі понад 75 років.

Загалом у 25–30% пацієнтів із НKK діагностуються очевидні метастази при першому виявленні захворювання. Приблизно у третій частині пацієнтів із НKK згодом розвивається метастатична хвороба. Таким чином, у приблизно 50–60% усіх пацієнтів із НKK кінець кінцем розвивається метастатична хвороба. Серед хворих із метастазами у приблизно 75% спостерігаються метастази у легені, у 36% - у лімфовузлах та/або з розповсюдженням на м'які тканини, у 20% - у кістки і у 18% - у печінку.

НKK є карциномою з найвищим рівнем летальності серед пухлин сечостатевої системи з п'ятирічною виживаністю 65% у порівнянні з 82% і 100% п'ятирічною виживаністю для раку сечового міхура і передміхурової залози, відповідно (інформація для США за станом на 1972-2001 рр.). Середні значення виживаності через 5 років (до 1999 р.) після встановлення діагнозу (1990-1994 рр.) раку нирки були приблизно 58% у Європі, і НKK була класифікована декількома дослідниками як рак із лише сумнівним прогнозом. Загалом НKK є фатальним захворюванням приблизно для 80% пацієнтів. Таке високе значення свідчить про нагальну потребу медицини в ефективному та своєчасному методі клінічного спостереження та лікування рецидивів.

Виживаність сильно залежить від стадії розвитку пухлини, на якій був встановлений діагноз: 5-річна виживаність становить лише 12% у пацієнтів з пухлинними ураженнями з віддаленими метастазами, але 80% у пацієнтів із локалізованими злоякісними пухлинами.

Колоректальна карцинома (КРК) займає третє місце за розповсюдженістю в світі. Вперше діагностується близько 1 мільйона нових випадків раку товстої та прямої кишки щорічно, і, на відміну від більшості інших пухлин, він вражає чоловіків і жінок майже однаково (співвідношення 1,2:1). У Європі КРК є другим найбільш поширеним видом раку і другою найпоширенішою причиною смерті від раку як у чоловіків, так і у жінок. Щорічно вперше діагностується приблизно 380 000 випадків цього раку і приблизно 200 000 випадків смерті, пов'язаних із цією хворобою. За необробленими даними, захворюваність чоловіків та жінок у 2002 р. складала 88,3 і

84,0/100 000 населення, відповідно; необроблені дані по смертності - 34,8 і 35,2/100 000 населення, відповідно. Ці дані чітко відображають, наскільки важким тягарем є КРК як для кожної людини окремо, так і для суспільства в цілому.

КРК є раковою хворобою людей похилого віку, оскільки середній вік появи клінічних проявів хвороби у чоловіків та жінок становить 69 і 75 років, відповідно. Крім факторів, пов'язаних із харчуванням та способом життя (наприклад, ожирінням, браком фізичних навантажень, палінням, регулярним вживанням алкоголю), іншими факторами ризику є сімейний анамнез щодо КРК, спадкові види КРК (сімейний аденоматозний поліпоз [САП], атенуйований САП [атенуйований аденоматоз поліпоз coli], спадковий неполіпозний колоректальний рак [СНПКР], гамартонний поліпоз) та запальні захворювання кишечника, такі як виразковий коліт та хвороба Крона.

КРК здебільшого виникає як аденокарцинома слизових оболонок прямої кишки, сигмоподібної кишки, поперечної ободової/нижньої ободової і висхідної ободової/сліпої кишки. Ранні стадії колоректальної карциноми можна лікувати первинною хірургічною операцією. Однак віддалені метастази розповсюджуються на регіонарні лімфатичні вузли і на печінку, легені та інші органи (такі як ЦНС). У зв'язку з неспецифічними симптомами КРК часто діагностується на відносно пізній стадії, і приблизно у 25% пацієнтів, хворих на КРК, спостерігаються метастази (мКРК), коли вони вперше проходять обстеження у лікаря, який їх лікує. На додаток, у 30% пацієнтів із вперше діагностованою локалізованою резектабельною КРК згодом з'являються рецидиви метастазів.

У заявці EP2105740 описується, що деякі білки, включаючи аполіпопротеїн АІ (APOA1), регулюються підвищеною експресією с-тус у суб'єктів, що хворіють на рак або сприйнятливих до нього. Таким чином, у EP2105740 описується використання біомаркера APOA1 в діагностиці, визначенні прогнозу та/або моніторингу лікування ракової хвороби, зокрема раку легенів, але не для передбачення ефективності лікування, тим більше не імунотерапії.

У заявці WO2010/076322 описується метод передбачення відповіді на хіміотерапію та/або користі від її застосування у пацієнта, що страждає на рак, що включає (i) класифікацію пухлини щонайменше на два класи, (ii) визначення у зразку пухлини експресії щонайменше одного гена-маркера, що є свідченням відповіді пухлини кожного відповідного класу на хіміотерапію, (iii) і, залежно від згаданої експресії гена, передбачення згаданої відповіді та/або користі, де одним геном-маркером є CXCL13. У заявці WO2010/076322 також не описується передбачення ефективності лікування, тим більше імунотерапії.

Так само, у заявці WO2010/003773 описуються методи передбачення результатів лікування ракової хвороби у пацієнта, що страждає на рак, причому згаданому пацієнтові було раніше діагностовано ураження лімфовузлів, і він пройшов лікування методом цитотоксичної імунотерапії, де одним геном-маркером є CXCL13. У заявці WO2010/003773 не описується передбачення ефективності імунотерапії.

Заявка EP 1 777 523 A1 має відношення до прогнозу результату лікування ракового захворювання у пацієнта, прогноз якого базується на кількісному визначенні одного чи декількох біологічних маркерів, які свідчать про наявність або, альтернативно, на рівень адаптивної імунної відповіді згаданого пацієнта, що спрямована проти ракового захворювання. Загалом, розкрита надзвичайно велика кількість маркерів. Крім цього, EP 1 777 523 A1 стосується прогнозу (але не передбачення) результату лікування ракового захворювання у пацієнта, прогноз якого базується на виявленні та/або кількісному визначенні одного чи декількох біологічних маркерів, які свідчать про наявність або, альтернативно, на рівень адаптивної імунної відповіді згаданого пацієнта, що спрямована проти ракового захворювання в місці локалізації пухлини.

Незважаючи на нещодавній прогрес у діагностиці та веденні багатьох видів раку, як це описано вище, таких як, наприклад, НМК і КРК, існує необхідність у біологічних маркерах, які можна було б застосовувати з метою підвищення якості діагностики і особливо для передбачення того, чи можна очікувати користь від імунотерапії, з метою подальшого підвищення виживаності і розширення можливостей вносити корективи у лікування людей, що його потребують. Крім цього, маркери мають також дозволити передбачувати кінцевий результат згаданого лікування раку. Тому метою цього винаходу є розробка відповідних біологічних маркерів і методів діагностики, передбачення ефекту від лікування і прогностичних методів.

У першому аспекті цього винаходу згадану мету досягають за рахунок розробки методу передбачення ефективності імунотерапії у пацієнта, хворого на рак, що включає: а) визначення рівня щонайменше одного маркера, який вибраний із групи, що містить аполіпопротеїн А1 (ApoA1), CCL17/TARC, еозинофіли (абсолютну кількість або %), моноцити (абсолютну кількість

або %), CD95/Fas, аспартатамінотрансферазу/глутаматоксалоацетаттрансаміназу (АсАТ/СГОТ) сироватки, раковий антиген 19-9 (CA19-9), лактатдегідрогеназу (ЛДГ), треонін, імуноглобулін Е (IgE) та матричну металопротеїназу 3 (ММР-3) у зразку, отриманому від пацієнта, хворого на рак, в якому вищий (або підвищений) рівень маркера у порівнянні з медіанним значенням для даної популяції пацієнтів, хворих на рак, є свідченням користі від застосування імунотерапії у згаданого пацієнта, або б) визначення рівня щонайменше одного маркера, вибраного з групи, що містить CXCL13/BCA-1, нейтрофіли (у %), інтерлейкін 6 (ІЛ-6) та ацилкарнітини з коротким ланцюгом у зразку, отриманому від пацієнта, хворого на рак, в якому більш низький (знижений) рівень маркера у порівнянні з медіанним значенням (+/-10%) для даної популяції пацієнтів, хворих на рак, є свідченням користі від застосування імунотерапії у згаданого пацієнта.

У цьому втіленні винахід стосується одиничних (які також мають назви «моноваріантних» та «окремих») маркерів для передбачення ефекту, зокрема користі від застосування імунотерапії у пацієнта, хворого на рак, як описано в цьому документі, такого як подовження загальної виживаності, одна чи декілька Т-клітинних відповідей, що були викликані імунотерапією, уповільнення росту пухлини, скорочення пухлини або поліпшення виживаності без прогресування.

У контексті цього винаходу терміни «маркер», «біомаркер», «аналіт» або «параметр» є взаємозамінними і всі вони стосуються маркера(ів), що аналізуються в контексті методу(ів) відповідно до цього винаходу.

У контексті цього винаходу використання термінів «передбачення», «маркер для передбачення» виходить з поняття «маркери» згідно з цим винаходом, які є інформативними з точки зору ефективності протиракової імунотерапії, такої, наприклад, як терапія з використанням вакцин(и), як описано в цьому документі.

Як з'ясувалося, CXCL13/BCA-1, АроА1, нейтрофіли, еозинофіли, моноцити, CD95/Fas, АсАТ/СГОТ, CCL17/TARC, ацилкарнітини з коротким ланцюгом і CA19-9 є маркерами, що передбачають загальну виживаність і в деяких випадках відповідь Т-клітин за допомогою одновимірних аналізів.

Переважає метод відповідно до цього винаходу, в якому згаданий маркер вибраний із АроА1 та/або CCL17/TARC. Рівні CCL17/TARC, що перевищують медіанне значення для відповідної досліджуваної популяції, і рівні АроА1, що перевищують медіанне значення, як це зазначено виробником відповідного аналітичного засобу (наприклад, компанією Rules Based Medicine (RBM), 0,288 мг/мл), є позитивними.

Переважає метод відповідно до цього винаходу, в якому згаданий маркер вибраний із CXCL13/BCA-1 або моноцитів. Однак цей винахід включає також комбінації маркерів, такі як, наприклад, вибрані з АроА1 і CCL17/TARC; АроА1 і CXCL13/BCA-1; АроА1, CXCL13/BCA-1 і моноцити; АроА1, CCL17/TARC, CXCL13/BCA-1 і моноцити; CCL17/TARC і CXCL13/BCA-1; CCL17/TARC, CXCL13/BCA-1 і моноцити; CCL17/TARC, АроА1 і моноцити; CCL17/TARC, АроА1 і CXCL13/BCA-1; CCL17/TARC і моноцити; CXCL13/BCA-1 і моноцити; АроА1 і моноцити. Всі ці комбінації маркерів є особливо переважними.

Інші переважні комбінації маркерів вибрані з CXCL13/BCA-1, нейтрофілів у %, АроА1, еозинофілів у %, еозинофілів у абсолютних числах (абсолютна кількість), моноцитів у %, FAS, TARC; ЛДГ, Thg, ІЛ-6, альбуміну, IgE, ММР-3, CA19-9; моноцитів у абсолютних числах, АсАТ, білірубін, ацилкарнітинів (scAC); і ІЛ-33. Всі ці комбінації маркерів також є особливо переважними.

АроА1 є основним білком ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ), і його можна міряти замість ЛПВЩ у клінічних аналізах. У нормальних умовах ЛПВЩ демонструють антисклеротичні, антиоксидантні, антитромботичні та протизапальні властивості. Однак в умовах хронічного запального процесу/окислювального стресу (наприклад, за наявності хронічних інфекційних процесів, аутоімунних захворювань, метаболічного синдрому і раку) ЛПВЩ втрачають ці властивості і набувають прозапальні властивості. У прозапальних ЛПВЩ (ріHDL) рівень АроА1 – негативного білка гострої фази - знижується, а інших білків, таких як амілоїд А сироватки (SAA) – позитивного білка гострої фази - підвищується. Таким чином, низькі рівні АроА1 є свідченням хронічного запального процесу і окислювальних умов, і вони можуть, у свою чергу, сприяти виникненню таких станів, котрі, як відомо, сприяють розвитку ракового захворювання. Про знижені рівні АроА1 повідомлялося у зв'язку з багатьма видами ракових захворювань, і вони також спостерігалися у пацієнтів із НКК у когорті дослідження ІМА901-202 (фази ІІ). Заслугує на увагу, що повідомлялося про те, що споріднений білок АроА2 є позитивним прогностичним маркером метастатичної НКК, і в досліджах на мишах була показана функціональна причетність АроА1 до пригнічення прогресування раку (Su et al., 2010; Vermaat et al., 2010). На додаток до їхньої здатності сприяти розвитку ракового захворювання, як відомо

також, реакції хронічної та гострої фази та окислювальний стрес також несприятливо діють на відповідь адаптивної імунної системи (Haeryfar and Berczi, 2001; Muller et al., 2008; Vallejo et al., 2004).

CCL17/TARC є хемокіном, що спочатку був класифікований як хемокін, що притягує клітини TH2, однак він має також інші клітинні мішені, такі як ефекторні клітини/Т-клітини пам'яті типів TH1 і TH2, особливо ті, що здатні мігрувати у шкіру, субпопуляцію CD8+ Т-клітин, Т-клітини пам'яті TH17, NK- і NKT-клітини, дендритні клітини тощо. Досліди на мишах показали, що внутрішньопухлинна експресія CCL17/TARC є сприятливою для реакцій імунного відторгнення. Рівні у сироватці можуть свідчити про активність міелоїдних дендритних клітин, макрофагів і моноцитів, які є основними джерелами цього хемокіну. Як було показано, постійна продукція CCL17 дендритними клітинами є передумовою їхньої унікальної функції з ініціації антиген-незалежних відповідей у Т-клітинах. На відміну від таких хвороб як atopічний дерматит і деяких інших алергічних або аутоімунних хвороб, за яких рівень CCL17/TARC є патологічно підвищеним, що вважають за свідцтво підвищеної активності TH2, рівні CCL17/TARC залишалися у межах норми у популяції суб'єктів клінічного дослідження IMA901-202 і співвідносилися з цитокінами типу TH1, такими як IL-12 та IFN- γ ма.

У контексті цього винаходу рівні AroA1 та рівні CCL17/TARC, що були вищими за медіанні рівні у пацієнтів із НKK на пізніх стадіях, вважалися такими, що сприяють успіху лікування. Для пацієнтів, у яких щонайменше один фактор перевищує згадані порогові значення (статистично - близько 75%), передбачається покращений кінцевий клінічний результат після вакцинації протираковою вакциною IMA901 (Immatics Biotechnologies, Тюбінген, Німеччина) у порівнянні з пацієнтами, обидва фактори яких є нижчими, ніж порогові значення. У пацієнтів з обома факторами, що перевищують указані порогові значення (статистично - близько 25%), передбачається найбільша користь від лікування. Нижня межа норми (НМН) для AroA1 залежить від методу аналізу. Якщо користуватися мультиплексним аналізом з мікросферами Luminesx (компанії RBM), НМН дорівнює 0,288 мг/мл. Якщо користуватися іншими методами аналізу, НМН треба відкоригувати або виходячи з інформації, наданої виробником, шляхом проведення паралельних експериментів з порівнянням результатів з результатами, що отримані загальноприйнятим методом, або вимірюванням статистично значущої кількості зразків від здорових донорів. Медіанні рівні CCL17/TARC та/або AroA1 для певної популяції пацієнтів залежить від популяції та від методу кількісного аналізу.

Переважають методи визначення рівня маркерів і конкретно AroA1 та CCL17/TARC вибрані із групи імунологічних методів, таких як ELISA, мультиплексний імунохімічний аналіз з використанням мікросфер, чипів або планшетів, методи протеоміки, або з мас-спектрометрії, аналізів біологічної активності, електрофорезу, імунонефелометрії, імунотурбідиметрії, ферментативних методів аналізу, колориметричних або флюорометричних методів аналізу, з оцінкою, наприклад, за допомогою фотометрії і методів, на основі сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS). Нейтрофіли, еозинофіли і моноцити можна визначити за допомогою сортування FACS або інших загальноприйнятих у клінічній практиці гематологічних методів. AroA1 має високий рівень кореляції з холестерином ЛПВЩ і тому може бути визначеним усіма методами визначення холестерину ЛПВЩ.

Крім цього, як маркер був ідентифікований хемокін 1(CXCL13/BCA-1), що притягує В-клітини. Очевидно, CXCL13/BCA-1 є необхідним для організації заселення лімфоїдних органів лімфоцитами. Підвищені рівні для деяких видів пухлин пов'язані з метастазами і несприятливим прогнозом і, можливо, з порушеннями протипухлинних імунних відповідей.

Еозинофіли, чиї рівні у відсотках і абсолютних числах були ідентифіковані як маркер, якщо взяти до уваги повідомлення, що суперечать одне одному, можуть відігравати декілька, причім протилежних, функцій при захворюванні на рак. Рекрутинг еозинофілів у місце локалізації пухлини є напевне позитивним явищем у декількох випадках. Рекрутинг еозинофілів у місце ін'єкції Г-КСФ був виявлений у випадку меланоми.

Моноцити, рівні яких у відсотках і абсолютних числах були ідентифіковані як маркер, рекрутуються до місць запалення або місць введення Г-КСФ. Вони здатні диференціюватися у мікрофаги або дендритні клітини і можуть самі відігравати роль АПК. Вони можуть замінити тканинні дендритні клітини, що емігрували, такі як клітини Лангерганса. Навпаки, моноцитоз описували як негативний фактор при хворобі на рак і терапії НKK введенням IL-2, ймовірно, у зв'язку з утворенням активних форм кисню (АФК) і інгібуванням NK- і Т-клітин.

Розчинний CD95/Fas генерується шляхом альтернативного сплайсингу і конкурує з CD95, що зв'язаний з мембраною, за зв'язування CD95L/FasL. Таким чином, він може відвертати апоптоз Т-клітин, наприклад, в місці локалізації пухлини (контратака на пухлину). Він також може протидіяти неапоптотичним функціям сигнальних шляхів CD95, що сприяє рухливості та

інвазивності ракових клітин. CD95 може також мати зв'язок із еозинофілами, відвертаючи їхній апоптоз. Навпаки, CD95 може також інгібувати CD95L-опосередковане знищення Т-клітин, у деяких видах це корелює з високим пухлинним навантаженням і несприятливим прогнозом.

Відомо, що нейтрофіли є негативним прогностичним маркером при захворюванні на рак. 5
Взокрема, високе співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів вказує на несприятливий прогноз для декількох видів раку. У цьому випадку припускається можливість додаткового несприятливого впливу на імунотерапію Ракового захворювання. Нейтрофіли можуть протидіяти імунним реакціям шляхом інгібування Т- і NK-клітин.

Рівень ацилкарнітинів з коротким ланцюгом підвищується у випадку зниженої швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), що свідчить про більш серйозне ушкодження нирки, яке може призвести до зниженого доступу кров'яних клітин до пухлини (Wanner 1988). З іншого боку, повідомлялося, що рівень розчинних у кислотах ацилкарнітинів (вільних і з коротким ланцюгом) є нижчим у хворих на рак, ніж у пацієнтів групи контролю (Sachean 1987).

CA19-9 є епітопом на сіалюваній структурі Льюїса А, вуглеводним антигеном муцинового типу, такого як MUC1. Його присутність у сироватці може корелювати з експресією MUC у пухлині і, у такий спосіб, із присутністю одного з антигенів вакцини. Навпаки, пухлинні маркери у сироватці зазвичай є негативними прогностичними маркерами.

АсАТ/СГОТ є ферментом, задіяним у метаболізмі амінокислот. Як і у випадку ЛДГ, підвищений рівень у сироватці слугує індикатором підвищеного обігу клітин, як це відбувається у випадку ураження печінки та інших органів, а також при раковому захворюванні. Отримані нами результати підтверджують, що високі рівні АсАТ/СГОТ і ЛДГ є негативними прогностичними факторами при раковому захворюванні, але неочікуваним є те, що результати також показали, що, напевно, вони є позитивними передбачувальними факторами кінцевого результату імунотерапії. Причина цього досі не зрозуміла. Можна зробити припущення, що загибель клітин усередині пухлини, особливо у формі некрозу, сприяє імунним реакціям в місці локалізації пухлини.

В іншому аспекті метод за цим винаходом додатково включає: с) визначення рівня щонайменше одного маркера, який вибраний із групи, що містить альбумін і прямий білірубін у згаданому зразку від пацієнта, хворого на рак, де більш високий рівень у порівнянні з медіанними значеннями (+/-10%) для даної популяції пацієнтів, хворих на рак, є свідченням користі від застосування імунотерапії у згаданого пацієнта, або d) визначення рівня маркера інтерлейкіна 33 (ІЛ-33) у зразку, отриманому від пацієнта, хворого на рак, в якому більш низький рівень маркера у порівнянні з медіанним значенням (+/-10%) для даної популяції пацієнтів, хворих на рак, є свідченням користі від застосування імунотерапії у згаданого пацієнта.

Згідно з цим аспектом винаходу, вказані маркери використовуються з метою додаткової підтримки одиничних маркерів, згаданих вище у першому аспекті цього винаходу. Таким чином, ці маркери використовуються для створення набору чи панелі маркерів для «багатовимірного» аналізу для цілей діагностики.

Особливо переважним є метод відповідно до цього винаходу, в якому згаданий набір або панель маркерів для багатовимірного аналізу складається з таких маркерів як CXCL13/BCA-1, АроА1, нейтрофіли, еозинофіли (у відсотках і абсолютних числах), моноцити (у відсотках і абсолютних числах), CD95/FAS, АсАТ/СГОТ, CCL17/TARC, ЛДГ, Thr, ІЛ-6, ацилкарнітини з коротким ланцюгом, альбумін, білірубін, ІgE, ІЛ-33, MMP-3 і CA19-9.

Згідно з метою цього винаходу референтне значення рівню маркера є пороговим значенням для кожного маркера, яке визначає, чи отримає пацієнт користь від імунної терапії. Залежно від того, чи є маркер негативним або позитивним, більш високий або більш низький його рівень у пацієнта у порівнянні з референтним значенням є ознакою того, чи можна очікувати користь від імунної терапії. Референтне значення в одному варіанті втілення складає +/-10% від медіанного значення концентрації, що спостерігається у даної популяції пацієнтів, хворих на рак. Більш переважно, якщо референтне значення, залежно від того, чи є воно негативним чи позитивним, відповідає верхній чи нижній квартилі, або верхній чи нижній квінтілі, або верхній чи нижній децилі даної популяції пацієнтів, хворих на рак. Найбільш переважно, якщо референтне значення негативного маркера, аж до якого пацієнтів вважають за таких, що отримують користь від лікування, відповідає 70-й процентилі, 80-й процентилі і, найбільш переважно, 90-й процентилі. Для позитивних маркерів найбільш переважно, якщо референтне значення, починаючи з якого, як вважається, пацієнти мають отримати користь від лікування, відповідає 30-й процентилі, 20-й процентилі і, найбільш переважно, 10-й процентилі.

Інший важливий аспект цього винаходу стосується методу відповідно до цього винаходу, в якому згадана імунотерапія включає вакцинацію протираковою вакциною, необов'язково - разом із ад'ювантом, таким як, наприклад, Г-КСФ.

Імунотерапія і відповідні вакцини описані в існуючому рівні техніки. Імунотерапія хворих на рак пацієнтів націлена на специфічну активацію клітин імунної системи, особливо так званих цитотоксичних Т-клітин (ЦТК, також відомих як «кілерні клітини», також відомих як CD8+ Т-клітини) проти клітин пухлини, але не проти клітин здорової тканини. Пухлинні клітини відрізняються від здорових клітин експресією пухлино-асоційованих та пухлино-специфічних білків. Молекули HLA презентують назовні на клітинних поверхнях частину вмісту клітин, у такий спосіб надаючи ЦТЛ можливість відрізнати здорові клітини від пухлинних. Це відбувається шляхом розщеплення усіх білків всередині клітини на короткі пептиди, які потім прикріплюються до молекул HLA і презентуються на клітинній поверхні. Пептиди, які презентуються на пухлинних клітинах, але не презентуються або у набагато меншій мірі презентуються на здорових клітинах організму, мають назву пухлино-асоційованих пептидів (TUMAP). Антигенами, епітопи яких розпізнаються пухлино-специфічними Т-клітинами, можуть бути молекули усіх класів білків, таких як , рецептори, фактори транскрипції тощо.

Однак примування одного типу ЦТЛ зазвичай недостатньо для знищення всіх пухлинних клітин. Пухлинам властива сильна мутагенна дія і, таким чином, вони здатні швидко реагувати на атаки ЦТЛ шляхом змінення їхньої білкової структури, щоб уникати розпізнавання цитотоксичними клітинами. Для протидії механізмам уникнення пухлин від атаки для вакцинації використовувалися різноманітні специфічні пептиди. У такий спосіб можна здійснити загальну одночасну атаку на пухлину декількома клонами ЦТЛ. Це може зменшити шанси пухлини ухилитися від імунної відповіді. Ця гіпотеза нещодавно одержала підтвердження у клінічному дослідженні лікування пацієнтів з меланою на пізніх стадіях. За лише кількома виключеннями, пацієнти, що дали щонайменше три чіткі Т-клітинні відповіді, демонстрували об'єктивні клінічні відповіді або стабілізацію захворювання, а також підвищену виживаність, у той час як переважній більшості пацієнтів з менш ніж трьома Т-клітинними відповідями було діагностовано прогресування захворювання (Banchereau et al., 2001).

Переважаючим препаратом/композицією, що застосовується в контексті методів за цим винаходом, є протипухлинна вакцина на основі пептидів. Інші переважні препарати включають вакцини на основі ДНК і РНК, наприклад, описані Weide і співавт. (Weide B, Garbe C, Rammensee HG, Pascolo S. Immunol. Lett. 2008 Jan 15;115(1):33-42. Epub 2007 Oct 26) вакцини на основі дендритних клітин, вакцини з використанням лізатів клітин або клітинних ліній первинних пухлин, або окремих компонентів пухлинних клітин, які включають цільні білки або білки теплового шоку. Медикамент може вводитися безпосередньо пацієнтові, тобто в уражений орган, або системно в/ш, в/м, п/ш, в/ч, п/о і в/в, або вноситися *ex vivo* у клітини, отримані від пацієнта чи у клітинну лінію людини, котрі згодом вводяться пацієнту, або використовуватись *in vitro* для вибору субпопуляції з імунних клітин, які отримані від пацієнта і які потім знов вводяться йому. Вакцинні антигени, наприклад, пептиди, можуть бути, по суті, чистими, або у комбінації з імуностимулюючим ад'ювантом (див. нижче), чи використовуватись в комбінації з імуностимулюючими цитокінами, або вводиться 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 працю Longenecker et al (1993)). Пептиди також може бути міченими або бути злитими білками чи гібридними молекулами. Очікується, що пептиди, послідовності яких наведені у цьому винаході, стимулюють CD4+ або CD8+ Т-клітини. Проте стимуляція CD8+ ЦТЛ є більш ефективною за умови сприяння з боку CD4+ Т-хелперних клітин. Таким чином, для епітопів МНС I класу, які стимулюють CD8+ ЦТЛ, партнер по злиттю або сегменти гібридної молекули принагідно постачають епітопи, які стимулюють CD4+ Т-клітини. CD4+-стимулюючі епітопи добре відомі фахівцям в цій галузі техніки і включають епітопи, що були ідентифіковані в правцевому анатоксині. В ще одному переважному втіленні пептид є злитим білком, зокрема, таким, що містить N-термінальні амінокислоти HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii). В одному втіленні пептид за винаходом є усіченим білком людини або злитим білком, отриманим із білкового фрагмента і іншої поліпептидної частки за умови, що частка біологічного компонента людини включає одну або більше амінокислотних послідовностей за винаходом.

Для застосування вакцина може також містити один або більше ад'ювантів. Переважними ад'ювантами є іміквімод, резиквімод, Г-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. Як згадувалося вище, медикамент застосовується для парентерального введення, такого як підшкірне, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове або оральне введення. Для цього пептиди і необов'язково інші молекули розчиняють або суспендують у фармацевтично прийнятному, переважно водному носію. 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 праці A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed. 2000, вид. «American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press». Композиція може застосовуватися для попередження, профілактики та/або терапії ракових захворювань, таких як, наприклад, НКК і КРК. Приклади комбінацій пептидів для вакцин, які можна застосовувати у контексті цього винаходу, наведені нижче у таблицях 1А – 1D і мають назви IMA901, IMA910, IMA941 і IMA950, відповідно.

Таблиця 1А

IMA901 (наприклад, використання при НКК)

SEQ ID No:	Скороч.	Білок	Послідовність
1	MMP-001	Матрична металопротеїназа 7	SQDDIKGIQKLYGKRS
2	ADF-002	Адиопфілін	VMAGDIYSV
3	ADF-001	Адиопфілін	SVASTITGV
4	APO-001	Аполіпопротеїн L1	ALADGVQKV
5	CCN-001	Циклін D1	LLGATCMFV
6	GUC-001	GUCY1A3	SVFAGVVG
7	K67-001	KIAA0367	ALFDGDPHL
8	MET-001	Протоонкоген c met	YVDPVITSI
9	MUC-001	MUC1	STAPPVHNV
10	RGS-001	RGS 5	LAALPHSCL

10

Таблиця 1В

IMA910 (наприклад, використання при раку товстої кишки)

SEQ ID No:	Скороч.	Послідовність
11	C20-001	ALSNLEVT
12	NOX-001	ILAPVILYI
13	ODC-001	ILDQKINEV
14	PCN-001	KLMDLDVEQL
15	TGFBI-001	ALFVRLLALA
16	TOP-001	KIFDEILVNA
17	TGFBI-004	TPPIDAHTRNLLRNH
18	CEA-006	SPQYSWRINGIPQQHT
5	CCN-001	LLGATCMFV
9	MUC-001	STAPPVHNV
1	MMP-001	SQDDIKGIQKLYGKRS
19	CEA-004	YLSGANLNL
8	MET-001	YVDPVITSI

Таблиця 1С

ІМА941 (наприклад, використання при раку шлунка)

SEQ ID NO	Ід. № пептиду	Послідовність
20	CDC2-001	LYQILQGIVF
21	ASPM-002	SYNPLWLR
22	UCHL5-001	NYLPIFIMEL
23	MET-006	SYIDVLPEF
24	PROM1-001	SYIIDPLNL
25	UQCRB-001	YYNAAGFNKL
26	MST1R-001	NYLLYVSNF
27	PPAP2C-001	AYLVYTDRL
28	SMC4-001	HYKPTPLYF
29	MMP11-001	VWSDVTPLTF

Таблиця 1D

ІМА950 (наприклад, використання при гліобластомі)

SEQ ID NO	Ід. № пептиду	Послідовність
30	CSP-001	TMLARLASA
31	FABP7-001	LTFGDVAV
32	NLGN4X-001	NLDTLMTYV
33	TNC-001	AMTQLLAGV
34	NRCAM-001	GLWHHQTEV
35	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
36	BCA-002	ALWAWPSEL
37	MET-005	TFSYVDPVITSISPKYG

Таблиця 1Е

ІМА990а (наприклад, використання при раку передміхурової залози)

SEQ ID NO	Ід. № пептиду	Послідовність
38	PSA-001	FLTPKKLQCV
39	PSA-002	KLQCVDLHV
40	PSA-003	VISNDVCAQV*
41	PSCA-001	ALQPGTALL*
42	PSCA-002	AILALLPAL
43	PSMA-001	LLHETDSAV*
44	PSMA-002	ALFDIESKV
45	Сурвівін-004	ELTLGEFLKL
46	Сурвівін-005	TLPPAWQPFL
47	TRP-P8-001	GLMKYIGEV
48	PROSTEIN-001	CLAAGITYV
49	PSMA-001	NYTLRVDCTPLMYSL
50	Сурвівін-001	TLGEFLKLDREKAKN

5 * Необов'язково не включений

Таким чином, у ще одному переважному варіанті методу відповідно до цього винаходу згадана протиракова вакцина вибрана з протиракової вакцини, що включає щонайменше один

імуногенний пептид, вибраний із групи SEQ ID No. 1 до 37, наприклад, що включає SEQ ID No. 1 до 10; SEQ ID No. 11 до 19 і 1, 5, 8 і 9; SEQ ID No. 20 до 29, і SEQ ID No. 30 до 37.

В іншому варіанті методу відповідно до цього винаходу згаданий пацієнт отримує лікування або пройшов попереднє лікування. Види такого попереднього лікування можуть включати, наприклад, лікувальну хірургічну операцію, променеву терапію та/або хіміотерапію. Переважним попереднім лікуванням є терапія на основі протиракового препарату, вибраного з цитокінів і інгібіторів тирозинкінази (ІТК), таких як сорафеніб і сунітиніб, та циклофосфаміду. В цьому варіанті згаданий метод лікування ракового захворювання можна вибрати з методів, які описані вище; переважним є імунотерапія, переважно яка включає використання протиракової вакцини, необов'язково - разом із Г-КСФ.

Раковими захворюваннями, які належить лікувати, можуть бути всі види ракових захворювань, чутливих до імунотерапії, переважно, якщо вони вибрані з групи, що включає НКК, КРК, рак шлунка (РШ), меланому, немілоклітинного раку легенів (НМРЛ), гліобластому і, в цілому, аденокарциному будь-якого виду.

Зразки, які аналізують у контексті цього винаходу, можна вибрати з цільної крові, периферичної крові та її фракцій, сироватки, лейкоцитарної плівки, пухлинної тканини, лімфатичної рідини, сечі, кісткового мозку, плазми з ЕДТА, гепаринізованої плазми, цитратної плазми, гепаринізованої цільної крові і замороженої гепаринізованої цільної крові. Вибір зразка для аналізу залежить також від маркера(ів), який(і) має(ють) бути проаналізований(і), і фахівець у цій галузі здатний вибрати належний зразок відповідно до цього.

У переважному втіленні метод за цим винаходом може додатково включати прогноз ефективності протиракової імунотерапії у пацієнта, де згаданий пацієнт переважно отримав попереднє лікування циклофосфамідом (як це описано вище). У контексті цього винаходу терміни «прогноз» або «прогностичний маркер» базуються на маркерах, згаданих у цьому документі, які є інформативними щодо ефективності, виходячи зі звичайних або стандартних методів лікування раку, таких як, наприклад, із застосуванням таксолів, сполук платини та інших загальновідомих речовин, що використовуються в хіміотерапії ракового(их) захворювання(нь). Прогнозована ефективність може бути вибрана з загальної виживаності, наявності однієї або декількох Т-клітинних відповідей на імунотерапію, уповільнення росту пухлини або виживаності без прогресування. Таким чином, маркери за цим винаходом можуть використовуватися за «змішаними» сценаріями з передбачувальними та прогностичними функціями.

В іншому аспекті винаходу метод відповідно до цього винаходу додатково включає моніторинг ефективності згаданого лікування ракового захворювання у пацієнта, що включає повторення етапу визначення а) та/або б) і неозов'язково с) та/або d), як це розкрито тут щонайменше один раз. Зазвичай моніторинг виконується під час лікування через регулярні проміжки часу, наприклад, щотижнево, двічі на тиждень або навіть щомісяця.

Переважним є метод відповідно до цього винаходу, у якому згадана процедура визначення включає щонайменше один метод, вибраний із імунохімічного аналізу, імунохімічного аналізу з використанням мікросфер, мультиплексного імунохімічного аналізу, ELISA, методів на базі мікрочипів, епігенетичних методів, аналізу експресії, сортуванні клітин FACS, мас-спектрометрії, методів клінічної гематології та інших стандартних клінічних методів, таких як електрофорез, імунонефелометрія, імунотурбідиметрія, ферментативні методи аналізу, колориметричні або флюорометричні методи. Усі ці методи добре відомі фахівцю у цій галузі і описані в літературі.

Ще один аспект цього винаходу стосується діагностичного набору, що включає матеріали для проведення методу відповідно до цього винаходу як описано тут, в одному чи декількох контейнерах, які переважно містять (i) щонайменше одне маркер-специфічне антитіло, специфічне до AроA1, CCL17/TARC, Fas, AcAT/СГОТ, CA19-9, ЛДГ, IgE, матричної металопротеїнази 3 (MMP-3), CXCL13/BCA-1, нейтрофілів, інтерлейкіну-6 (ІЛ-6), інтерлейкіну-33 (ІЛ-33), альбуміну і білірубину, необов'язково разом із (ii) інструкціями з виконання згаданого методу.

Набір може додатково включати один або більше iii) буферів, (iv) розріджувачів, (v) фільтрів, (vi) голок або (v) шприців. Контейнер є переважно бутелем, флаконом, шприцом або пробіркою; і він може бути контейнером багаторазового застосування. Контейнер може бути виготовленим із багатьох видів матеріалів, таких як скло або пластмаса. Переважно, якщо набір та/або контейнер містить(ять) інструкції із застосування контейнера або пов'язані з контейнером, які містять вказівки щодо відновлення та/або застосування. Наприклад, на етикетці може бути наведена інформація щодо відновлення ліофілізованої композиції до певних концентрацій антитіл, що відповідають характеристикам вищезгаданих методів, таких як ELISA.

Ще один переважний аспект цього винаходу стосується удосконаленого методу лікування раку у пацієнта, хворого на рак і який має потребу у цьому лікуванні, що включає а) проведення

методу відповідно до цього винаходу як описано вище, і b) введення пацієнту, хворому на рак, відповідного імунотерапевтичного засобу, виходячи з результатів, отриманих на етапі a), і c) необов'язково, повторення етапів a) і b).

У цих терапевтичних аспектах винаходу методи відповідно до цього винаходу застосовуються з метою забезпечення удосконалених способів лікування у межах терапії, зокрема імунотерапії, ракових захворювань. Методи відповідно до цього винаходу надають додаткову та завчасну передбачувальну або передбачувальну та прогностичну інформацію щодо необхідності і ефективності імунологічного лікування раку і, таким чином, дозволяють прийняти більш інформовані рішення щодо подальшого лікування згаданого ракового захворювання. Таким чином, переважним є метод як описано вище, який додатково включає моніторинг ефективності згаданого лікування раку для пацієнта, що включає повторення етапу визначення щонайменше один раз.

Як описано вище, переважні лікарські засоби або препарати для попереднього лікування на додаток до імунотерапевтичних вакцин, які описані вище, вибрані з протиракового засобу, вибраному з цитокінів, сорафенібу, сунітинібу, циклофосфаміду та інгібіторів тирозинкіназ (ІТК). Раковими захворюваннями, які належить лікувати, можуть бути всі види ракових захворювань, чутливих до імунотерапії, переважно, якщо вони вибрані з нирково-клітинної карциноми (НKK), колоректальної карциноми (КРК), раку шлунка (РШ), меланоми, немілоклітинного раку легень (НМРЛ), гліобластоми і аденокарциноми.

Слід розуміти, що ознаки винаходу, які розкриті і описані тут, можуть використовуватися не лише у відповідній комбінації, описаній вище, але також поодиночі, не виходячи за обсяг патентних претензій цього винаходу.

Нижче винахід буде описаний докладніше шляхом наведення прикладів і посилань на перелік послідовностей. Наведені нижче приклади описані лише для ілюстрації і не мають на меті обмежити обсяг винаходу.

На фігурах:

На Фігурі 1 зображена оцінка впливу рівнів (A) ApoA1, (B) CXCL13/BCA-1, (C) моноцитів і D) CCL17/TARC на загальну виживаність усіх пацієнтів і підгруп згідно з моделлю Каплан-Мейера. Для кожного параметра на верхній фігурі показана виживаність усіх пацієнтів, що мають високий (червоні лінії) і низький (зелені лінії) рівень параметра. На нижній фігурі наведені результати аналізу у підгрупах (+CY у порівнянні з -CY) для пацієнтів, що мають високий рівень параметра (червоні і сині лінії) і для пацієнтів, що мають низький рівень параметра (зелені і жовті лінії).

На Фігурі 2A наведений розподіл значень одиничних біомаркерів ApoA1, CXCL13/BCA-1, моноцитів і CCL17/TARC, як це показано на фігурі, для підгруп -CY (сірий колір) і +CY (чорний колір), що свідчить або про відсутність Т-клітинної відповіді (no), або про відповідь на один пептид (1), або про відповідь на комплекс пептидів (>1). На планках похибок наведена середньоквадратична похибка для середнього значення. На Фігурі 2B наведено в інший спосіб розподіл показників рівня множинного біомаркера у пацієнтів підгруп -CY (сірий колір) і +CY (чорний колір), що свідчить або про відсутність Т-клітинної відповіді (no), або про відповідь на один пептид (1), або про відповідь на комплекс пептидів (>1). Точки відповідають окремим значенням, лінії відображають середнє значення.

На Фігурі 3 зображена оцінка впливу комбінації ApoA1 і CCL17/TARC на загальну виживаність усіх пацієнтів і пацієнтів підгруп за методом Каплан-Мейера. На A) визначено, що біомаркер-позитивна популяція має складатися з пацієнтів, що мають щонайменш один із двох параметрів у позитивному діапазоні (бал = 1 або 2), у той час як біомаркер-негативні пацієнти не мають жодного параметра в межах позитивного діапазону (бал = 0). На B) визначено, що біомаркер-позитивна популяція має складатися тільки з тих пацієнтів, що мають обидва параметри у позитивному діапазоні (бал = 2), у той час як пацієнти з хоча б одним параметром в межах негативного діапазону (бал = 0 або 1) вважаються біомаркер-негативними. На верхніх фігурах наведена виживаність усіх біомаркер-позитивних пацієнтів (зелені лінії) відносно всіх біомаркер-негативних пацієнтів (червоні лінії). На нижніх фігурах наведений аналіз у підгрупах (+CY у порівнянні з -CY) для біомаркер-позитивних пацієнтів (зелені лінії у порівнянні з жовтими) і біомаркер-негативних пацієнтів (червоні лінії у порівнянні з синіми).

На Фігурі 4A наведені середні значення рівня маркера, що складається з комбінації ApoA1 і CCL17/TARC у пацієнтів підгруп -CY (сірий колір) і +CY (чорний колір), що свідчить або про відсутність Т-клітинної відповіді (no), або про відповідь на один пептид (1), або про відповідь на комплекс пептидів (>1). На планках похибок наведена середньоквадратична похибка для середнього значення. На Фігурі 4B наведений в інший спосіб розподіл показників рівня подвійного біомаркера у пацієнтів підгруп -CY (сірий колір) і +CY (чорний колір), що свідчить

або про відсутність Т-клітинної відповіді (no), або про відповідь на один пептид (1), або про відповідь на комплекс пептидів (>1). Точки відповідають окремим значенням, лінії відображають середнє значення.

5 Фігура 5 демонструє оцінку впливу множинного біомаркера на загальну виживаність за методом Каплан-Мейера. На верхній фігурі показана виживаність усіх пацієнтів, що мають високий (червоні лінії) і низький (зелені лінії) рівень параметра. На нижній фігурі наведені результати аналізу у підгрупах (+СУ у порівнянні з –СУ) для пацієнтів, що мають високий рівень параметра (червоні і сині лінії) і для пацієнтів, що мають низький рівень параметра (зелені і жовті лінії). Значення 0,019076043 використовували як порогове значення для поділу пацієнтів

10 на групи з високим і низьким вмістом біомаркера.
На Фігурі 6А наведені середні значення рівня множинного біомаркера у пацієнтів підгруп – СУ (сірий колір) і +СУ (чорний колір), що свідчить або про відсутність Т-клітинної відповіді (no), або про відповідь на один пептид (1), або про відповідь на комплекс пептидів (>1). На планках похибок наведена середньоквадратична похибка для середнього значення. На Фігурі 6В наведений в інший спосіб розподіл показників рівня множинного біомаркера у пацієнтів підгруп – СУ (сірий колір) і +СУ (чорний колір), що свідчить або про відсутність Т-клітинної відповіді (no), або про відповідь на один пептид (1), або про відповідь на комплекс пептидів (>1). Точки відповідають окремим значенням, лінії відображають середнє значення.

15 Послідовності SEQ ID No. 1 до 50 відображають амінокислотні послідовності, наведені вище
20 у таблицях з 1А до 1Е.

Таблиця 2

Одиночні біомаркери	BP і логранговий критерій p			
	АроА1	CXCL13/BCA-1	Моноцити	CCL17/TARC
Усі пацієнти	0,42 (0,01)	0,39 (0,006)	0,44 (0,012)	0,41 (0,011)
Біомаркер-позитивні у порівнянні з біомаркер-негативними				
Підгрупа +СУ, Біомаркер-позитивні у порівнянні з біомаркер-негативними	0,3 (0,017)	0,25 (0,004)	0,24 (0,001)	0,18 (0,003)
Підгрупа -СУ, Біомаркер-позитивні у порівнянні з біомаркер-негативними	0,6 (0,253)	0,7 (0,448)	0,93 (0,874)	0,67 (0,392)
Біомаркер-позитивна група, Підгрупа +СУ у порівнянні з –СУ	0,36 (0,061)	0,35 (0,051)	0,29 (0,014)	0,22 (0,017)
Біомаркер-негативна група, Підгрупа +СУ у порівнянні з –СУ	0,84 (0,696)	1,07 (0,876)	1,31 (0,538)	0,85 (0,715)
Взаємодія	0,43 (0,24)	0,3271 (0,13)	0,22 (0,03)	0,26 (0,094)
Параметр сприятливий, якщо значення високі/низькі	високі	низькі	високі	високі
Порогове значення	0,264 мг/мл (МЕДІАНА)	64,21 пг/мл (МЕДІАНА)	7,7% (МЕДІАНА)	161,99 пг/мл (МЕДІАНА)

У Таблиці 2 наведені значення відношення ризиків (BP) і логрангового критерію p (модель пропорційних ризиків Кокса) для передбачення загальної виживаності за допомогою одиничних біомаркерів у всіх пацієнтів і підгруп +/-СУ, BP і логрангового критерію p для оцінки ефективності попереднього лікування циклофосфамідом серед біомаркер-позитивних і біомаркер-негативних пацієнтів і для ефекту взаємодії біомаркерів і попереднього лікування циклофосфамідом.

Таблиця 3

Значення p (t-критерій Уелча)	ApoA1	CXCL13/BCA-1	Моноцити	CCL17/TARC
Усі пацієнти з імунними відповідями	0,016	0,28	0,24	0,032
Усі пацієнти з імунними відповідями на комплекс пептидів	0,000074	0,031	0,34	0,0028
Підгрупа +CY, пацієнти з імунними відповідями	0,014	0,064	0,0021	0,013
Підгрупа +CY, пацієнти з імунними відповідями на комплекс пептидів	0,42	0,29	0,37	0,53
Підгрупа -CY, пацієнти з імунними відповідями	0,034	0,15	0,065	0,017
Підгрупа -CY, пацієнти з імунними відповідями на комплекс пептидів	0,00014	0,13	0,73	0,068
Параметр сприятливий, якщо значення високі/низькі	високі	низькі	високі	високі

- 5 У Таблиці 3 наведені p-значення, розраховані за допомогою одновимірного статистичного аналізу (t-критерій Уелча) для передбачення Т-клітинних відповідей і Т-клітинних відповідей на комплекс пептидів з використанням вибраних параметрів для всіх пацієнтів і підгруп +/-CY.

Таблиця 4

Таблиця 4

Множинний біомаркер (OSCY_CHEAP_UNIF_20)	BP (95% HI (надійний інтервал) і логранговий критерій p
Усі пацієнти	0,47;
Біомаркер-позитивні у порівнянні з біомаркер-негативними	P=0,041
Підгрупа +CY,	0,07;
Біомаркер-позитивні у порівнянні з біомаркер-негативними	P=0,000008
Підгрупа -CY,	1,58;
Біомаркер-позитивні у порівнянні з біомаркер-негативними	P=0,203
Біомаркер-позитивна група,	0,08 (0,02-0,38);
Підгрупа +CY у порівнянні з -CY	P=0,000135
Біомаркер-негативна група,	2,5 (0,95-6,58);
Підгрупа +CY у порівнянні з -CY	P=0,055
Взаємодія	0,032 (0,0055-0,1863);
	P=0,000128
Параметр сприятливий, якщо значення високі/низькі	Високі
Порогове значення	0,019076043 пункту

- 10 У Таблиці 4 наведені значення відношення ризиків (BP) і лонгрангового критерію p для передбачення загальної виживаності за допомогою множинного біомаркера у всіх пацієнтів і підгруп +/-CY, BP і лонгрангового критерію p для оцінки ефективності попереднього лікування циклофосфамідом серед біомаркер-позитивних і біомаркер-негативних пацієнтів і для ефекту взаємодії біомаркера і попереднього лікування циклофосфамідом.

Приклади

- 15 Введення

- 20 ІМА901 є вакциною на основі пептидів, яка була розроблена з метою індукування специфічних Т-клітинних реакцій проти комплексів пептид-МНС, виявлених на клітинах НКК. В дослідженні ІМА901-202 (фази II) використовувався одновимірний і багатовимірний аналіз для ідентифікації параметрів, які поодиночці і в комбінації слугують передбачувальними біомаркерами успіху що стосується індукції імунної відповіді і збільшення загальної виживаності пацієнтів з метастатичною НКК, що отримували лікування вакциною ІМА901.

- 25 З цією метою було проаналізовано близько 450 параметрів (параметри пацієнта та пухлини, а також рівні аналітів у сироватці або сечі і параметри клітин) з використанням зразків популяції суб'єктів дослідження ІМА901-202 (фази II), що були зібрані до лікування. З метою зниження витрат на виміри під час майбутніх досліджень параметри, які потребують обробки моноклеарних клітин периферичної крові (PBMC), не були включені в багатовимірний аналіз,

для якого відбирався набір із декількох параметрів. Параметри аналізували на їхній зв'язок із загальною виживаністю та Т-клітинними відповідями.

Оскільки лікування вакциною IMA901 привело до набагато більшого ефекту на загальну виживаність після попереднього лікування циклофосфамідом та оскільки тільки у підгрупі пацієнтів +СУ наявність імунних відповідей асоціювалася з покращеною загальною виживаністю, підгрупа +СУ була вибрана як досліджувальна група, і результати для неї порівнювали з підгрупою –СУ, яку вважали за контроль. Таким чином, були вибрані параметри, які показували взаємодію з попереднім лікуванням циклофосфамідом та/або які передбачали загальну виживаність краще в підгрупі +СУ, ніж у підгрупі –СУ. У такий спосіб уникали вибору чисто прогностичних маркерів, які за визначенням показували б взаємозв'язок із загальною виживаністю в обох підгрупах.

2. Порівняння пацієнтів дослідження з сумісними за віком здоровими донорами

Для порівняння рівнів до лікування з рівнями здорових донорів були вибрані тільки пацієнти, що підлягали лікуванню (ITT), молодше 70 років, щоб забезпечити відповідність щодо віку найбільш літнім здоровим донорам групи контролю. Сформовані групи пацієнтів (N=52) і здорові донори (N=22) були збалансовані щодо віку, статі і статусу ЦМВ (цитомегаловірус)-серопозитивності.

3. Матеріали і методи

Збір зразків

Усі зразки були зібрані до будь-якого терапевтичного втручання у межах дослідження, або за три дні до вакцинації, або безпосередньо перед введенням циклофосфаміду у підгрупі +СУ, або безпосередньо перед вакцинацією. Зразки сироватки були зібрані за допомогою пробірок VACUTAINER з розділювальним гелем (Becton Dickinson, 5 мл), які перевертали та інкубували протягом не менш ніж 30 хвилин. Пробірки центрифугували протягом 15 хвилин при не менш ніж 1200 g, і сироватку (приблизно 2 мл) переносили у кріопробірку NUNC (3,6 мл). Кріопробірки негайно поміщали на зберігання при $\leq -20^{\circ}\text{C}$ до проведення вимірів. Кров з EDTA для аналізу гематологічних параметрів збирали у пробірки VACUTAINER з EDTA на 3 мл, які не центрифугували та зберігали при кімнатній температурі до проведення аналізу. Пробу сечі відбирали незадовго до вакцинації. Для аналізу за допомогою тест-смужок використовували тільки свіжу сечу. Цитратну плазму для аналізу коагуляції збирали приблизно за два тижні до вакцинації. Зразки збирали за допомогою пробірок з цитратом VACUTAINER і центрифугували протягом 30 хвилин при не менш ніж 1200 g при кімнатній температурі. Супернатант плазми переносили у мікропробірки.

Виміри

Методи визначення рівню біомаркерів включали ELISA, мультиплексний імунохімічний аналіз, епігенетичні методи, мас-спектрометрію, клітинне сортування FACS, стандартні методи клінічної гематології, клінічні хімічні аналізи, аналізи сечі та інші методи. Параметри, які були зрештою вибрані, вимірювали за допомогою мультиплексного аналізу на наборах компаній RBM (ApoA1, CD95/FAS, IL-6, IgE, MMP-3, CA19-9), Millipore (CXCL13/BCA-1, CCL17/TARC), IL-33) і методом мас-спектрометрії на діагностикумах компанії Biocrates (треонін, ацилкарнітини з коротким ланцюгом). Дані з інших параметрів були надані лабораторією центру і були отримані стандартними гематологічними методами (нейтрофіли, еозинофіли, моноцити) і клінічними хімічними аналізами (АсАТ/СГОТ, ЛДГ, альбумін, білірубін).

Оцінка Т-клітинних відповідей

Оскільки проводили аналіз не лише для встановлення взаємозв'язку між біомаркерами та загальною виживаністю, але й між біомаркерами та однією або декількома Т-клітинними відповідями, проводили вимірювання специфічних Т-клітинних відповідей декілька разів до та після вакцинації методом ELISPOT і тетрамерним забарвлюванням відповідних комплексів пептидів з молекулами МНС.

Одновимірний статистичний аналіз:

Оцінку взаємозв'язку параметрів з Т-клітинними відповідями проводили за допомогою t-критерію Уелча. Параметри, які дозволяють передбачати Т-клітинні відповіді у всіх пацієнтів та/або всередині підгрупи +СУ з $p < 0,05$, вважали за значущі.

Взаємодію параметрів з попереднім лікуванням для підгрупи СУ оцінювали за допомогою моделі пропорційних ризиків Кокса. Кандидати, які мали р-значення $< 0,05$ для параметрів взаємодії при будь-якому пороговому значенні, яке не розташовувалося на крайніх ділянках кривої розподілу (тобто вибір та відміна вибору $> \sim 5\%$ пацієнтів), вважалися як такі, що становлять інтерес.

Окрім того, щоб виключити параметри із значущою взаємодією у зв'язку зі зворотнім взаємозв'язком попереднього лікування циклофосфамідом із загальною виживаністю в групі з

несприятливими значеннями біомаркерів, використовували додатковий критерій значущого взаємозв'язку ($p < 0,05$) з загальною виживаністю у біомаркер-позитивної групи. Значущий ($p < 0,05$) взаємозв'язок із загальною виживаністю у підгрупі +СУ, але не в підгрупі –СУ, вважали за додаткову ознаку того, що параметр має передбачувальне, але не прогностичне, значення.

Додаткові критерії вибору параметрів базувалися на їхніх біологічних властивостях і на збереження ними моделі взаємодії з попереднім лікуванням циклофосфамідом і на взаємозв'язку із загальною виживаністю у підгрупі +СУ, але не в підгрупі –СУ, у таких пацієнтів, що отримували попереднє лікування ІТК або цитокінами.

Були розраховані кореляції між параметрами. Параметри з високим ступенем кореляції з іншими параметрами у наборі даних, що залишилися (скориговане р-значення $< 0,005$), були виключені.

Після ідентифікації окремих параметрів за допомогою цих етапів були проведені тести, чи демонструють ці параметри і у яких комбінаціях найкращі результати щодо передбачення загальної виживаності і Т-клітинних відповідей, а також була проаналізована їхня стабільність у підгрупах пацієнтів, згаданих вище.

Багатовимірний статистичний аналіз:

Множинні біомаркери були визначені згідно з моделлю пропорційних ризиків Кокса, їхні властивості і додатки описані нижче.

Як коваріанти у генералізованій лінійній моделі розглядалися усі параметри, хоча й вони були лінійно трансформовані у нульове середнє значення та одиничне стандартне відхилення («стандартизовані» параметри) для того, щоб запобігти зайвого впливу на параметри, що були представлені невеликими значеннями. З метою зниження витрат на вимірювання параметрів набору, включені лише такі параметри, що не потребують виділення РВМС. Оскільки відповідна модель максимальної правдоподібності при неповній відповіді була недовизначена, тобто кількість параметрів перевищувала кількість пацієнтів, модель доповнили апріорним Гаусовським розподілом, який обмежує відносний вплив кожного параметра в оптимальному біомаркері. Відомо, що відповідний алгоритм оптимізації за максимумом апостеріорної ймовірності (MAP) покращує передбачувальну здатність результатів («регуляризація»), отриманих за допомогою методу максимальної правдоподібності. Модель була доповнена апріорним розподілом Лапласа, що забезпечує використання для оптимізації лише однієї підмножини параметрів, що розглядаються. У такий спосіб кількість параметрів, включених у біомаркер, була обмежена до 20.

Додатково є бажаним, щоби множинний біомаркер не мав передбачувального значення для підгрупи -СУ або щоб він щонайменше мав менше передбачувальне значення для цих пацієнтів, ніж для пацієнтів підгрупи +СУ. З цією метою для підгрупи -СУ були оптимізовані ітеративні передбачувальні моделі, і отримані напрями проєцювали з простору параметрів, доки не залишилися тільки по суті не передбачувані напрями. Самий біомаркер був потім визначений на підпросторі параметрів, що залишився, для підгрупи +СУ. Щоби оцінити передбачувальну точність біомаркера, весь процес оптимізації провели методом послідовного виключення об'єктів аналізу один за одним. У такий спосіб передбачення для всіх пацієнтів були розраховані, згруповані і потім порівняні з відомими термінами виживання.

Результати: Одновимірний аналіз

Вибір параметрів

Із приблизно 450 досліджених параметрів 59 значуще передбачали наявність Т-клітинних відповідей як/або для усіх пацієнтів, так і/або для підгрупи +СУ. 118 параметрів показали значущу взаємодію з попереднім лікуванням циклофосфамідом за умови оптимального вибору порогових значень. Використовуючи вищезгадані критерії передбачення Т-клітинної відповіді, взаємодію з попереднім лікуванням циклофосфамідом, кращий взаємозв'язок із загальною виживаністю в підгрупі +СУ, ніж у підгрупі –СУ, відсутність статистичної невизначеності по відношенню до інших параметрів і наявність мотивованого біологічного обґрунтування, можна ідентифікувати чотири параметри (ApoA1, CXCL13/BCA-1, моноцити і CCL17/TARC) як найкращі кандидати в одиничні біомаркери.

Визначення порогових значень

Для кожного з чотирьох параметрів, що були ідентифіковані вище, визначали певне порогове значення, за яким пацієнтів розділяли на дві групи (позитивну і негативну стосовно біомаркера), які давали значуще різний кінцевий результат лікування препаратом IMA901. Вибір порогових значень був необхідним, оскільки параметри, хоча вони і пов'язані з загальною виживаністю і Т-клітинними відповідями у безперервній, а не дискретній формі, мають використовуватися для прийняття рішень щодо лікування, які обмежені відповідями так/ні. З цієї

причини належні порогові значення мають а) включати достатню кількість пацієнтів і б) бути об'єктивними.

Що стосується АроА1, для якого у більш ніж 50% пацієнтів дослідження ІМА901-202 спостерігалися патологічно низькі рівні, за порогове значення була вибрана нижня межа норми, встановлена у здорових донорів згідно з рекомендаціями виробника діагностикума (компанія RBM, 0,288 мг/мл), що ідентифікує пацієнтів з рівнями АроА1 у межах норми як біомаркер-позитивну групу. Це порогове значення було близьким до медіанного значення для пацієнтів дослідження ІМА901-202 (0,264 мг/мл). Таким чином, це порогове значення є максимально об'єктивним і пов'язане з біологічним обґрунтуванням відносно АроА. Як альтернатива для АроА1 використовувалося також медіанне значення. Всі інші параметри пацієнтів дослідження ІМА901-202 знаходилися, головним чином, у межах норми. Для цих параметрів як порогові значення були вибрані медіанні значення для популяції дослідження, оскільки вони також є об'єктивними і включають достатню кількість пацієнтів (50%).

Передбачення загальної виживаності і Т-клітинних відповідей окремими одиночними біомаркерами

Аналіз з використанням моделі пропорційних ризиків Кокса показав, що всі чотири параметри, вибрані за допомогою одновимірної аналізу, значуще передбачають загальну виживаність у всіх пацієнтів і в підгрупі пацієнтів, які отримали попереднє лікування циклофосфамідом, але не у підгрупі, яка не отримувала попереднього лікування циклофосфамідом (Таблиця 2, Фігура 1). У біомаркер-позитивних групах, визначених відповідним пороговим значенням для біомаркера, попереднє лікування циклофосфамідом мало значущий ($p < 0,05$) позитивний вплив на загальну виживаність (CCL17/TARC, моноцити) або виявило тенденцію ($p < 0,1$) у бік позитивного впливу на загальну виживаність (АроА1, CXCL13/BCA-1). Аналіз взаємодії показав, що вплив попереднього лікування циклофосфамідом був значуще відмінним ($p < 0,05$) у пацієнтів, класифікованих як позитивні або негативні щодо їхніх рівнів моноцитів. CCL17/TARC продемонстрував тенденцію взаємодії з попереднім лікуванням циклофосфамідом. АроА1 і CXCL13/BCA-1 не досягли статистичної значущості при вибраних порогових значеннях.

Слід відзначити, що в підгрупі +СҮ найкраще відношення ризиків (BP) можна отримати, якщо класифікувати пацієнтів за їхніми рівнями CCL17/TARC (Таблиця 2, BP=0,18, $p=0,003$). Навпаки, CCL17/TARC-позитивні пацієнти отримували найбільшу користь від попереднього лікування циклофосфамідом (Таблиця 2, BP=0,22, $p=0,017$).

CCL17/TARC також має виняткові властивості, якщо взяти до уваги той факт, що 75% CCL17/TARC-позитивних пацієнтів, що отримали попереднє лікування циклофосфамідом, все ще були живими на час закінчення дослідження (Фігура 1D).

Картина, яку спостерігали відносно передбачення загальної виживаності, залишалася стабільною для субпопуляції пацієнтів, що отримали попереднє лікування ІТК або цитокінами (дані не показані).

Відносно передбачення Т-клітинної відповіді, найкращі результати показали CCL17/TARC і АроА1, обидва з яких значуще передбачували пацієнтів з імунною відповіддю серед усіх пацієнтів і в обох підгрупах, +СҮ і –СҮ, і передбачували пацієнтів з відповіддю на комплекс пептидів серед усіх пацієнтів. Навпаки, CXCL13/BCA-1 і моноцити мали слабку передбачувальну здатність (Таблиця 3).

5. Результати: Багатовимірний аналіз

Вибір параметрів

Для всієї популяції пацієнтів був розрахований набір біомаркерів, що включає 20 параметрів, який краще передбачає загальну виживаність після лікування препаратом ІМА901 у підгрупі +СҮ, ніж у підгрупі –СҮ. Параметри цього набору наведені у Таблиці 4. Вони включають цитокіни, хемокіни та інші білки, вміст яких можна виміряти у сироватці, клітинні параметри, які можна виміряти стандартними гематологічними методами, і метаболомічні параметри, які можна виміряти за допомогою мас-спектрометрії. Окрім оптимізації для усіх пацієнтів (тренувальна версія), набір біомаркерів був розрахований методом перехресної валідації одинарними виключеннями (тестова версія). Останній з цих аналізів є більш доречним, оскільки він гарантує стійкість оцінки результатів під час наступного спостереження. Дані, отримані у цих експериментах, відображають результати тестів.

Таблиця 5

Вага	Ранг	Назва параметра
-47.3867	1	CXCL13/BCA-1
38.38821	2	ApoA1
-38.1861	3	Нейтрофіли (%)
34.36199	4	Еозинофіли (%)
34.10915	5	Моноцити (%)
33.89069	6	CD95/FAS
32.72272	7	AcAT/CGOT
32.01683	8	CCL17/TARC
31.7325	9	ЛДГ
31.47377	10	Thr
-31.3839	11	ІЛ-6
-31.2785	12	Ацилкарнітини з коротким ланцюгом
30.83843	13	Альбумін
30.78772	14	Еозинофіли (абс.)
29.57142	15	Моноцити (абс.)
28.89882	16	Білірубін (прямий)
28.63935	17	IgE
-27.8701	18	ІЛ-33
27.72058	19	MMP-3
27.204	20	CA19-9

5 У Таблиці 5 наведені параметри, включені у множинний біомаркер із 20 параметрів, та вага і ранг, що характеризують їх відносну важливість у наборі.

Значення біомаркера для кожного пацієнта є лінійною комбінацією значень, виміряних для 20 параметрів, включених в набір. Сталі множники в цьому рівнянні були вибрані таким чином, 10
щоби медіанне значення розподілу маркера було близьким до нуля. Значення біомаркера, розраховані у такий спосіб, мали приблизно нормальний розподіл в популяції пацієнтів дослідження IMA901-202, і вони були рівномірно розподілені між пацієнтами підгруп +СУ і –СУ.

Передбачення загальної виживаності і Т-клітинних відповідей набором множинного біомаркера

Щоб продемонструвати передбачувальну здатність біомаркера, проводили аналіз 15
виживання, поділивши пацієнтів на дві групи відповідно до значення біомаркера. Медіанне значення щільності розподілу рівня біомаркера по всій популяції пацієнтів було вибране як порогове значення, що включає 50% пацієнтів зі значеннями вище цього порогового значення у біомаркер-позитивну групу. У підгрупі пацієнтів +СУ біомаркер-позитивні пацієнти отримали високо значущу користь від вакцинації, в той час як біомаркер на засвідчив ніякого ефекту в 20
підгрупі –СУ. Навпаки, у біомаркер-позитивній групі попереднє лікування циклофосфамідом привело до значно кращої виживаності, у той час як ефект був незначущим або навіть (за тенденцією) протилежним у біомаркер-негативній групі (Таблиця 4, Фігура 5). Відповідно, спостерігалася високо значуща взаємодія між множинним біомаркером і попереднім лікуванням циклофосфамідом.

25 Хоча біомаркер не оптимізували для передбачення імунних відповідей, автори винаходу перевірили, чи існує також зв'язок розподілу значень біомаркера с наявністю або відсутністю Т-клітинних відповідей. Дійсно, спостерігалася тенденція у бік більш високих рівнів біомаркера у групах, що відповідали на пептид та на комплекс пептидів, особливо в підгрупі пацієнтів +СУ (Фігура 6).

30 Передбачення загальної виживаності і Т-клітинних відповідей за допомогою комбінації параметрів

Окремі параметри можна комбінувати у такий спосіб, щоби пацієнтам можна було встановити бали за шкалою на базі біомаркерів залежно від значень усіх параметрів, які включені у комбінацію. У разі комбінації двох параметрів кожний параметр може бути або 35
позитивним, або негативним відповідно до його порогового значення, і пацієнти могли отримати два бали за шкалою на базі біомаркерів (обидва параметри позитивні), один (один параметр позитивний) або нуль (жодного позитивного параметра) відносно комбінації маркерів.

Комбінація декількох параметрів для розрахунку числа балів за шкалою біомаркерів може бути корисною з декількох причин. По-перше, це веде до більшої стійкості оцінки, оскільки а) у деякій мірі вирішується проблема фіксованих порогових значень всупереч безперервному взаємозв'язку параметрів з результатом лікування, б) знижується вплив викидів результатів вимірів і с) більша кількість параметрів дозволяє врахувати більшу кількість біологічних процесів, які можуть мати значення для протиракового імунітету. По-друге, бальна модель забезпечує більшу гнучкість відносно вибору пацієнтів. В той час як окремих параметр із медіанним значенням у ролі об'єктивного порогового значення неминуче дозволяє вибрати для лікування лише 50% пацієнтів, бальна оцінка на базі двох параметрів (з пороговим значенням окремих параметрів, що дорівнює медіанному значенню розподілу) поділяє пацієнтів на три групи. Якщо виключити лише пацієнтів без позитивних маркерів (тобто тих, чий бал за біомаркерною шкалою дорівнює нулю), близько 75% пацієнтів будуть включені в групу лікування. Однак якщо бажаний рівень значущості не досягнутий у цій групі, можуть бути виключені пацієнти з нулем балів і одним балом, що залишає у групі лікування близько 25% пацієнтів з двома балами за шкалою на базі біомаркерів.

З цих причин було перевірено, чи дає комбінація окремих параметрів, визначених вище, кращі результати щодо передбачення загальної виживаності і Т-клітинних відповідей. Крім того, оцінювали стабільність ефекту для субпопуляцій пацієнтів, визначених вище. Декілька комбінацій маркерів у цьому відношенні переважали за своїми якостями застосування окремих параметрів, кращою з них була комбінація ApoA1 і CCL17/TARC (Фігура 3, Фігура 4).

6. Рівні маркерів:

6.1 Сироваткові рівні ApoA1

Стан	Джерело	ApoA1 [мг/мл]; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Здорові особи групи контролю	(Riesen, 2008)	1,0–1,5
	Виробник (RBM)	0,288–1,17
Учасники дослідження IMA901-202	Діапазон (медіана)	0,0808–0,514 (0,264)
	Середнє +/- ст. відх.	0,27 +/- 0,09

6.2 Сироваткові рівні CCL17/TARC

Стан	Джерело	TARC [пг/мл]; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Здорові особи групи контролю	(Shimada et al., 2004)	200 +/- 100
	(Fujii et al., 2004)	101 +/- 81
	(Sugawara et al., 2002)	31,9 +/- 14,8
	(Sekiya et al., 2002)	88,8 +/- 58,2
	(Echigo et al., 2006)	93,3 +/- 25,3
	(Saeki and Tamaki, 2006)	215,34 +/- 26,79
Атопічний дерматит	(Leung et al., 2003)	1125-3070 (1469)
	(Shimada et al., 2004)	96400 +/- 38100
	(Sugawara et al., 2002)	325 +/- 287
	(Saeki and Tamaki, 2006)	2338,7 +/- 301,83
Астма	(Sugawara et al., 2002)	271 +/- 264
	(Sekiya et al., 2002)	192,0 +/- 143,6
Алергічний риніт	(Sugawara et al., 2002)	147 +/- 101
Системний склероз	(Fujii et al., 2004)	313 +/- 294
Дерматоміозит		262 +/- 291
Системна червона вовчанка		254 +/- 326
Учасники дослідження IMA901-202	Діапазон (медіана)	25,5–623 (162)
	Середнє +/- ст. відх.	174 +/- 118

6.3 Сироваткові рівні ВСА-1

Стан	Джерело	ВСА-1 [пг/мл]; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Здорові особи групи контролю	(Panse et al., 2008)	~40
	(Sansonno et al., 2008)	48,2 +/-11,0
Захворювання	(Panse et al., 2008), рак молочної залози	~80
	(Sansonno et al., 2008), інфіковані гепатитом С пацієнти зі змішаною кріоглобулінемією та без неї	273,6 +/-98; 113,9 +/-40,2
Учасники дослідження IMA901-202	Діапазон (медіана)	13,09–1429,6 (64,21)
	Середнє +/- ст. відх.	114,23 +/- 196,98

5 6.4 Рівні нейтрофілів у відсотках і абсолютних числах

Стан	Джерело	Нейтрофіли; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Здорові особи групи контролю	LKF Kiel Laboratory, Німеччина	34–71 %; 1,5–6,2 x 10 ⁹ /л
	(Rashid et al., 2010), рак стравоходу	58–71 %
Захворювання	(Donskov et al., 2006), НКК	2,6–15,9 x 10 ⁹ /л
	Діапазон (медіана)	47–86,9 (67,3) %; 2,18–10,39 (4,44) x 10 ⁹ /л
Учасники дослідження IMA901-202	Середнє +/- ст. відх.	68,05 +/-8,2 %; 4,88 +/-1,86 x 10 ⁹ /л

6.5 Рівні еозинофілів у відсотках і абсолютних числах

Стан	Джерело	Еозинофіли; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Здорові особи групи контролю	LKF Kiel Laboratory, Німеччина	0–7 %; 0,04–0,6 x 10 ⁹ /л
	(Simon and Simon, 2007)	0–0,4 x 10 ⁹ /л
Захворювання	(Moroni et al., 2000), НКК	0,15 +/-0,1 x 10 ⁹ /л
Учасники дослідження IMA901-202	Діапазон (медіана)	0,2–6,5 (2) %; 0,02–0,55 (0,12) x 10 ⁹ /л
	Середнє +/- ст. відх.	2,35 +/-1,62 % 0,16 +/-0,13 x 10 ⁹ /л

10

6.6 Рівні моноцитів у відсотках і абсолютних числах

Стан	Джерело	Моноцити; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Здорові особи групи контролю	LKF Kiel Laboratory, Німеччина	4–13 %; 0,2–0,9 x 10 ⁹ /л
	(Sasaki et al., 2006), печінково-клітинний рак	0,03–1,04 x 10 ⁹ /л
Захворювання	(Donskov et al., 2006), НКК	0,69–0,74 x 10 ⁹ /л
	Діапазон (медіана)	3,1–17,7 (7,6) %; 0,2–1,31 (0,48) x 10 ⁹ /л
Учасники дослідження IMA901-202	Середнє +/- ст. відх.	8,19 +/-3,15 %; 0,57 +/-0,25 x 10 ⁹ /л

6.7 Сироваткові рівні розчинного CD95/FAS

Стан	Джерело	CD95/FAS [нг/мл]; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Учасники дослідження ІМА901-202	Діапазон (медіана)	4,09–20,4 (9,89)
	Середнє +/- ст. відх.	9,76 +/-3,06

5 6.8 Сироваткові рівні АсАТ/СГОТ

Стан	Джерело	АсАТ/СГОТ [Од/л]; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Здорові особи групи контролю	LKF Kiel	12–35,4
Учасники дослідження ІМА901-202	Діапазон (медіана)	14–109 (23,5)
	Середнє +/- ст. відх.	27,9 +/-17,3

6.9 Сироваткові рівні ЛДГ

Стан	Джерело	ЛДГ [Од/л]; Діапазон або середнє +/- ст. відх.
Здорові особи групи контролю	LKF Kiel	129–230
Учасники дослідження ІМА901-202	Діапазон (медіана)	94–734 (161,5)
	Середнє +/- ст. відх.	190,63 +/-98,97

10

6.10 Сироваткові рівні треоніну

Thg мін./макс.: 21 – 157 мкМ

Thg середнє/ст. відх.: 84,5 +/- 24,1 мкМ

15

МЕДІАННЕ: 82 мкМ

6.11 Сироваткові рівні альбуміну

Нормальні показники у сироватці та відхилення при патологічних станах:

Лабораторні показники: Альбумін 35-50 г/л (3,5-5 г/дл)

20

Параметр	СЕРЕДНЄ	Од. вимір.	Ст. відх.	Мін	Макс.	МЕДІАННЕ
альбумін крові	39,95	г/л	4,39	26	48	41

6.12 Рівні прямого білірубіну

Лабораторні показники: 0 – 5,1 мкМ

25

Сироваткові рівні у дослідженні ІМА-901:

мін./макс.: 0,5 – 4,4 мкМ (21 окреме значення)

СЕРЕДНЄ/СТ. ВІДХ.: 2,0 – 0,89 мкМ

МЕДІАННЕ: 1,7 мкМ

30

6.13 Рівні MMP-3

Діапазон у дослідженні ІМА-901:

мін./макс.: 1,85 – 41,2 нг/мл (лише 3 були вищими за 17; 58 різних значень)

СЕРЕДНЄ/СТ. ВІДХ.: 8,5 +/- 6,0 нг/мл

МЕДІАННЕ: 6,7 нг/мл

35

Нормальні рівні у сироватці: Діапазон згідно з даними виробника: 0,2 – 2,17 нг/мл

6.14 Рівні CA19-9

Розширений діапазон значень у сироватці (виробник)	Параметр	СЕРЕДНЄ	Од. вимір.	Ст. відх.	МІН.	МАКС.	МЕДІАННЕ	Під-рахунок
52	Раковий_антиген_19-9	15,63	Ед/мл	29,73	0	167	5,94	45

5 6.15 Рівні IgE

Параметр	СЕРЕДНЄ	Од. вимір.	Ст. відх.	Мін.	Макс.	МЕДІАННЕ
IgE	104,09	нг/мл	261,00	0	1362	22,5
Виробник (RBM): Нормальний рівень - аж до 606 нг/мл IgE						

6.16 Рівні ІЛ-6

10

Параметр	СЕРЕДНЄ	Од. вимір.	Ст. відх.	Мін.	Макс.	МЕДІАННЕ
ІЛ-6	16,32	пг/мл	67,65	0	532	2,86

Виробник (RBM): нормальний рівень - аж до 42,6 пг/мл ІЛ-6

6.17 Рівні ІЛ-33

Параметр	СЕРЕДНЄ	Од. вимір.	Ст. відх.	Мін.	Макс.	МЕДІАННЕ
ІЛ-33	166,95	пг/мл	293,28	55,0672	1867	75,73
нормальні рівні не визначені						

Перелік посилань

- 20 Donskov F, Hokland M, Marcussen N, Torp Madsen HH, von der MH (2006). Monocytes and neutrophils as 'bad guys' for the outcome of interleukin-2 with and without histamine in metastatic renal cell carcinoma--results from a randomised phase II trial. Br. J Cancer 94, 218-226.
- Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Sato S (2006). Both Th1 and Th2 chemokines are elevated in sera of patients with autoimmune blistering diseases. Arch. Dermatol. Res 298, 38-45.
- 25 Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S (2004). Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. J Dermatol. Sci. 35, 43-51.
- Haeryfar SM, Berczi I (2001). The thymus and the acute phase response. Cell Mol. Biol. (Noisy. - le-grand) 47, 145-156.
- 30 Leung TF, Ma KC, Hon KL, Lam CW, Wan H, Li CY, Chan IH (2003). Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children. Pediatr. Allergy Immunol. 14, 296-301.
- Moroni M, Porta C, De AM, Quaglini S, Cattabiani MA, Buzio C (2000). Eosinophils and C4 predict clinical failure of combination immunotherapy with very low dose subcutaneous interleukin-2 and interferon in renal cell carcinoma patients. Haematologica 85, 298-303.
- 35 Muller AJ, Sharma MD, Chandler PR, Duhadaway JB, Everhart ME, Johnson BA, III, Kahler DJ, Pihkala J, Soler AP, Munn DH, Prendergast GC, Mellor AL (2008). Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A 105, 17073-17078.
- 40 Panse J, Friedrichs K, Marx A, Hildebrandt Y, Luetkens T, Barrels K, Horn C, Stahl T, Cao Y, Milde-Langosch K, Niendorf A, Kroger N, Wenzel S, Leuwer R, Bokemeyer C, Hegewisch-Becker S, Atanackovic D (2008). Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients. Br. J Cancer 99, 930-938.
- 45 Rashid F, Waraich N, Bhatti I, Saha S, Khan RN, Ahmed J, Leeder PC, Larvin M, Iftikhar SY (2010). A pre-operative elevated neutrophil: lymphocyte ratio does not predict survival from oesophageal cancer resection. World J Surg Oncol 8, 1.

Riesen, WF (2008). Fettstoffwechsel, Referenzbereich. In Labor und Diagnose, L.Thomas, ed. (Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH), p. 236.

Saeki H, Tamaki K (2006). Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol. Sci.* 43, 75-84.

5 Sansonno D, Tucci FA, Troiani L, Lauletta G, Montrone M, Conteduca V, Sansonno L, Dammacco F (2008). Increased serum levels of the chemokine CXCL13 and up-regulation of its gene expression are distinctive features of HCV-related cryoglobulinemia and correlate with active cutaneous vasculitis. *Blood* 112, 1620-1627.

10 Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Kitano S (2006). Prognostic value of preoperative peripheral blood monocyte count in patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery* 139, 755-764.

Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, Sano Y, Morita A, Matsushima K, Hirai K (2002). Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy* 57, 173-177.

15 Shimada Y, Takehara K, Sato S (2004). Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol. Sci.* 34, 201-208.

Simon D, Simon HU (2007). Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1291-1300.

20 Su F, Kozak KR, Imaizumi S, Gao F, Amneus MW, Grijalva V, Ng C, Wagner A, Hough G, Farias-Eisner G, Anantharamaiah GM, Van Lenten BJ, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST, Farias-Eisner R (2010). Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Sugawara N, Yamashita T, Ote Y, Miura M, Terada N, Kurosawa M (2002). TARC in allergic disease. *Allergy* 57, 180-181.

25 Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ (2004). T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol. Med* 10, 119-124.

Vermaat JS, van dT, I, Mehra N, Sleijfer S, Haanen JB, Roodhart JM, Engwegen JY, Korse CM, Langenberg MH, Kruit W, Groenewegen G, Giles RH, Schellens JH, Beijnen JH, Voest EE (2010). Two-protein signature of novel serological markers apolipoprotein-A2 and serum amyloid alpha predicts prognosis in patients with metastatic renal cell cancer and improves the currently used prognostic survival models. *Ann Oncol* 21, 1472-1481.

Wanner, C., P. Schollmeyer, and W. H. Horl. 1988. Serum carnitine levels and carnitine esters of patients after kidney transplantation: role of immunosuppression. *Metabolism* 37:263-267.

35 Longenecker, B. M., M. Reddish, R. Koganty, and G. D. MacLean. 1993. Immune responses of mice and human breast cancer patients following immunization with synthetic sialyl-Tn conjugated to KLH plus detox adjuvant. *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690:276-291.

Sachan, D. S. and W. L. Dodson. 1987. The serum carnitine status of cancer patients. *J Am Coll.Nutr.* 6:145-150.

40 Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman, and J. Fay. 2001a. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 61:6451-6458.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

45

1. Спосіб передбачення ефективності імунотерапії у пацієнта, хворого на рак, що включає: визначення рівня маркера Аполіпопротеїн А1 (АpoA1), у зразку, отриманому від згаданого пацієнта, хворого на рак,

50 - в якому рівень зазначеного маркера принаймні на 10 % вищий за рівень маркера у порівнянні з медіанним значенням для даної популяції пацієнтів, хворих на рак, є свідченням ефективності від застосування імунотерапії для згаданого пацієнта, хворого на рак,

- в якому пацієнт, хворий на рак, має вид раку, вибраний з нирково-клітинної карциноми (НKK), колоректальної карциноми (КРК), раку шлунка (РШ), меланоми, немілоклітинного раку легень (НМРЛ), гліобластоми і аденокарциноми будь-якого виду;

55 - в якому зразок вибраний із цільної крові, периферичної крові або її фракцій, сироватки, лейкоцитарної плівки, пухлинної тканини, лімфатичної рідини, сечі, кісткового мозку, плазми з ЕДТА, гепаринізованої плазми, цитратної плазми, гепаринізованої цільної крові і її заморожених зразків, включаючи заморожену гепаринізовану цільну кров;

60 - де визначення включає щонайменше один метод, вибраний із методів імунохімічних аналізів, імунохімічних аналізів з використанням мікросфер, мультиплексних імунохімічних аналізів,

ELISA, методів на базі мікрочипів, епігенетичних методів, аналізу експресії, аналізів FACS, загальноприйнятих методів гематології, протеоміки і мас-спектрометрії;

- в якому імунотерапія включає вакцинацію протираковою вакциною, де зазначена вакцинація являє собою принаймні одну вакцину, що включає щонайменше один імуногенний пептид, вибраний з групи, яка складається з пептидів відповідно до послідовностей SEQ ID NO: 1-37; та - в якому ефективність вибрана з більш тривалої загальної виживаності, наявності однієї та/або декількох Т-клітинних відповідей на імунотерапію, уповільнення росту пухлини, скорочення пухлини та більш тривалої виживаності без прогресування.

2. Спосіб за п. 1, який додатково включає стадію визначення рівня щонайменше одного маркера, вибраного з групи, що містить хемокін (CXCL13/BCA-1), що притягує В-клітини, нейтрофіли, інтерлейкін 6 (ІЛ-6) та ацилкарнітини з коротким ланцюгом у зразку, отриманому від пацієнта, хворого на рак, причому рівень зазначеного маркера принаймні на 10 % нижчий за рівень маркера у порівнянні з медіанним значенням для даної популяції пацієнтів, хворих на рак, є свідченням ефективності від застосування імунотерапії для згаданого пацієнта.

3. Спосіб за п. 1 або п. 2, у якому зазначена вакцина включає ад'ювант, такий як, наприклад, ГМ-КСФ.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який додатково включає стадію визначення рівня щонайменше одного маркера, який вибраний із групи, що містить альбумін і прямий білірубін у згаданому зразку від пацієнта, причому рівень зазначеного маркера принаймні на 10 % вищий за рівень маркера у порівнянні з медіанним значенням для даної популяції пацієнтів, хворих на рак, є свідченням ефективності від застосування імунотерапії для згаданого пацієнта,

та, необов'язково, визначення рівня маркера інтерлейкіну 33 (ІЛ-33) у зразку, отриманому від пацієнта, хворого на рак, причому рівень зазначеного маркера принаймні на 10 % нижчий за рівень маркера у порівнянні з медіанним значенням для даної популяції пацієнтів, хворих на рак, є свідченням ефективності від застосування імунотерапії для згаданого пацієнта.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, в якому згаданий пацієнт отримує лікування або пройшов попереднє лікування методами, що включають хірургічну операцію, променеву терапію та/або хіміотерапію, і переважно, в якому згаданий пацієнт отримує лікування або пройшов попереднє лікування протираковим препаратом, вибраним з цитокінів і інгібіторів тирозинкінази (ІТК), таких як сорафеніб і сунітиніб та циклофосфамід.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який додатково включає прогнозування ефективності згаданої імунотерапії для пацієнта, на основі вказаного способу.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який додатково включає моніторинг ефективності згаданого лікування ракового захворювання у пацієнта, на основі вказаного способу, що включає повторення етапу визначення щонайменше один раз.

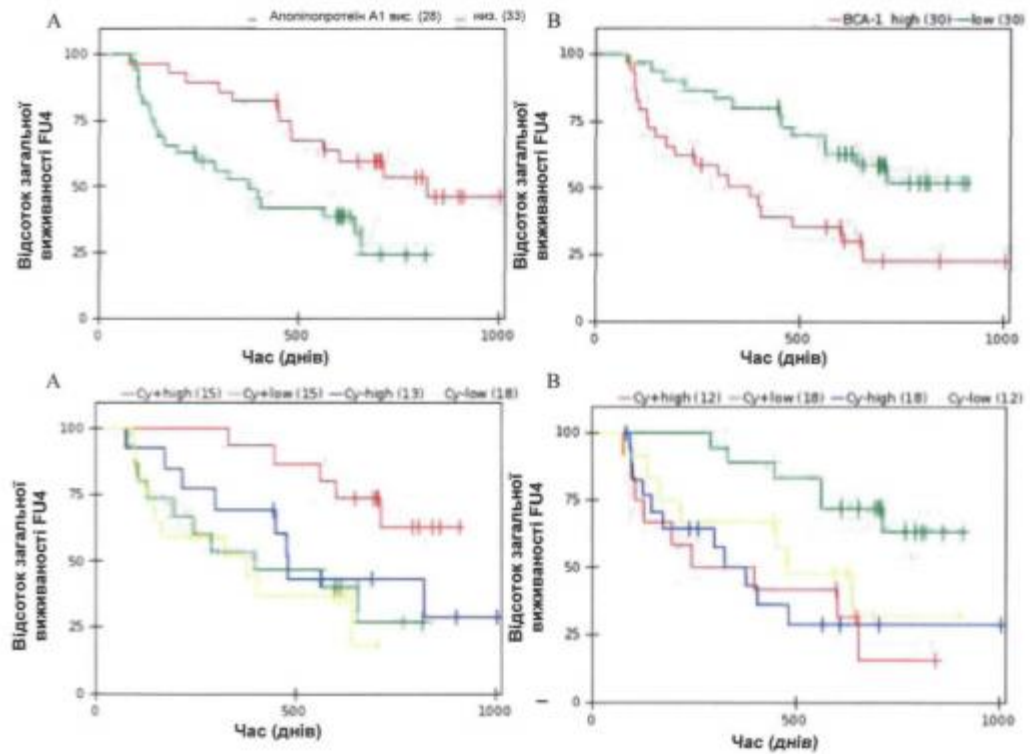
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому зазначений щонайменше один пептид вибраний із групи, яка складається з послідовностей SEQ ID NO: 1-10.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому зазначений щонайменше один пептид вибраний із групи, яка складається з послідовностей SEQ ID NO: 1, 5, 8, 9 та 11-19.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому зазначений щонайменше один пептид вибраний із групи, яка складається з послідовностей SEQ ID NO: 20-29.

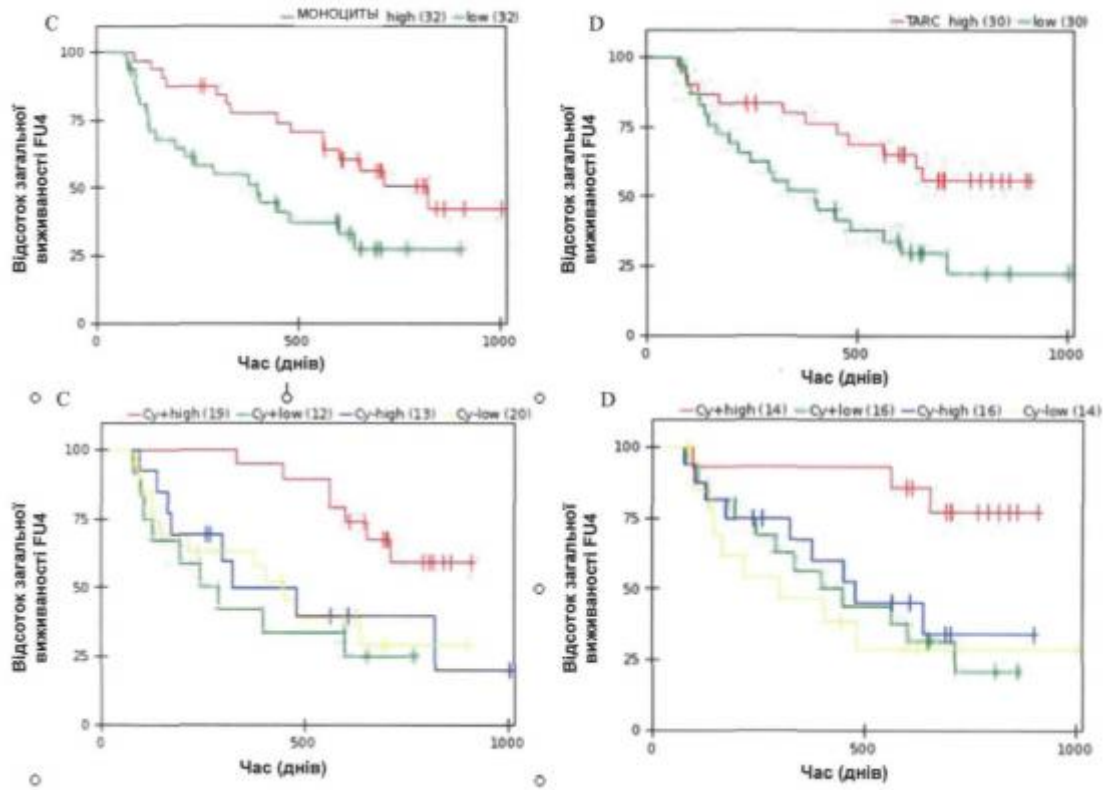
11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому зазначений щонайменше один пептид вибраний із групи, яка складається з послідовностей SEQ ID NO: 30-37.

Фігура 1

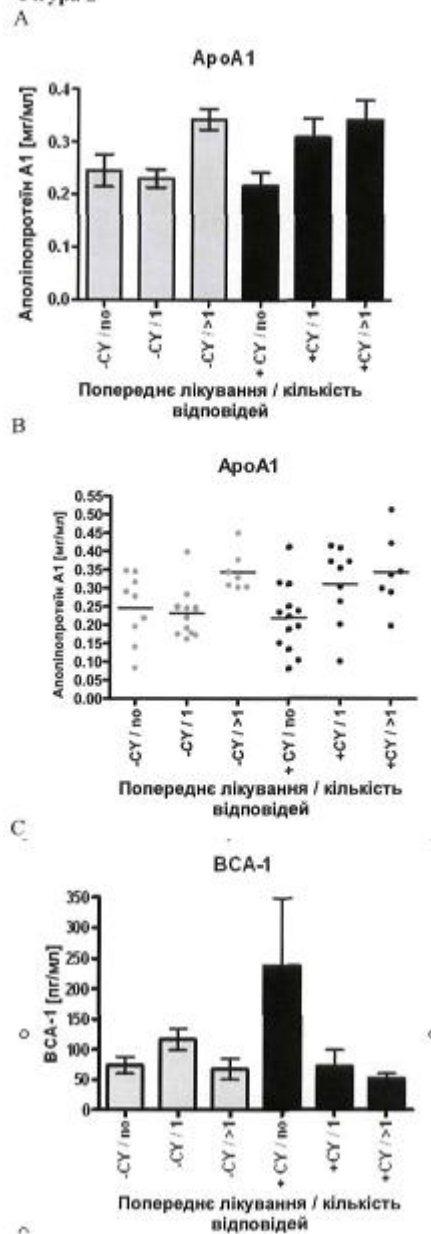


High = високий; low = низький

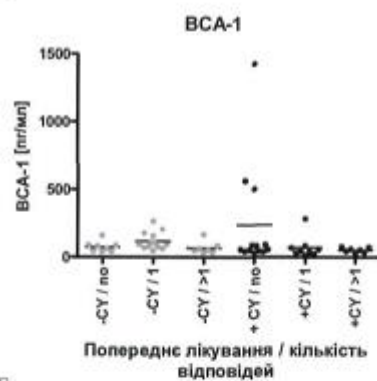
Фігура 1 (продовження)



Фігура 2



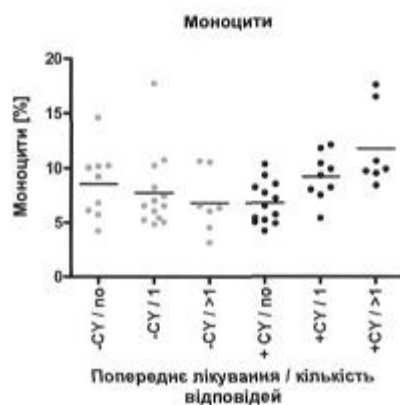
Фігура 2 (продовження)
D



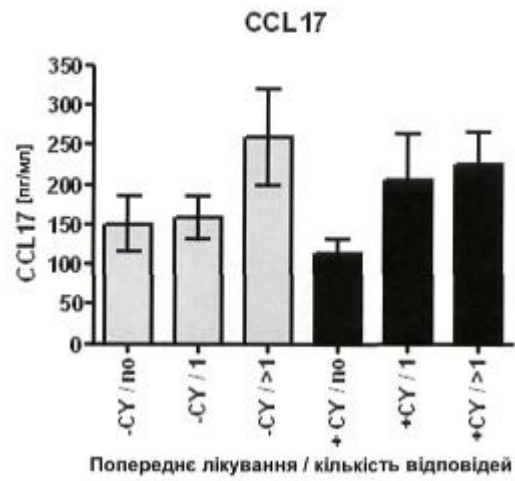
E



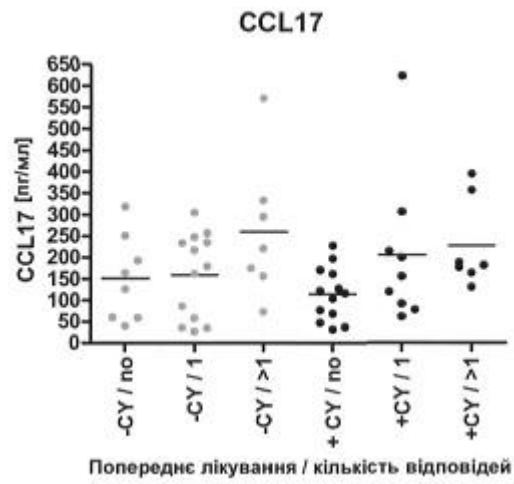
F

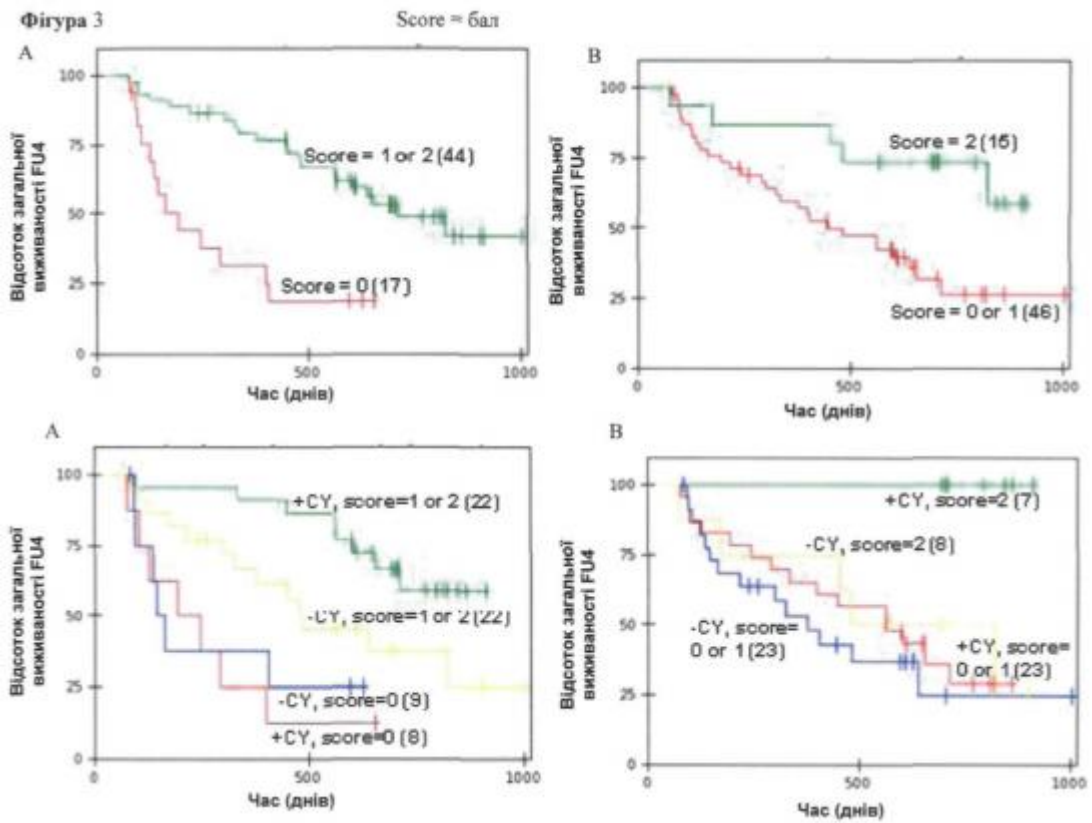


Фігура 2 (продовження)
G



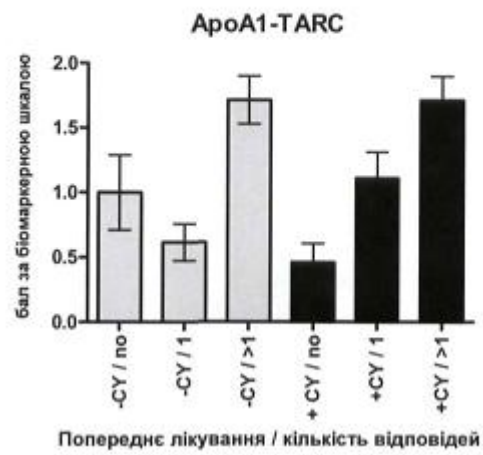
H



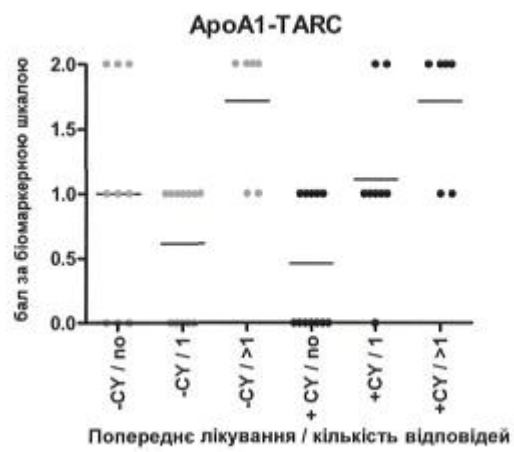


Фігура 4

A

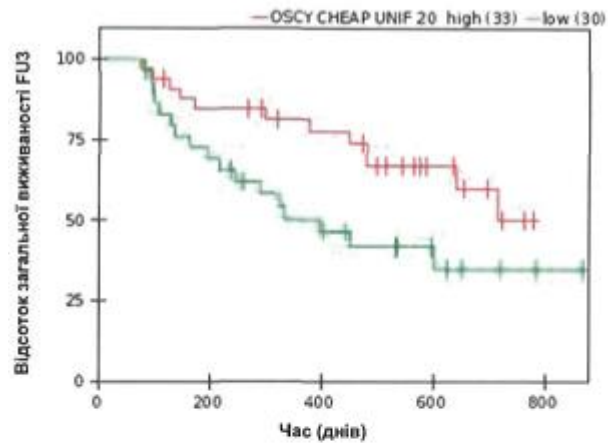


B

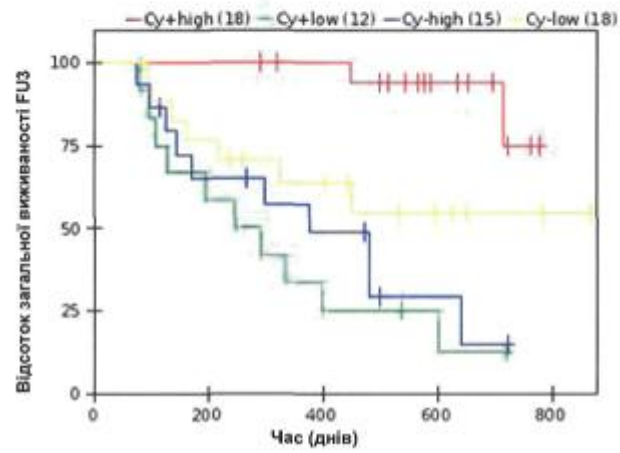


Фігура 5

A



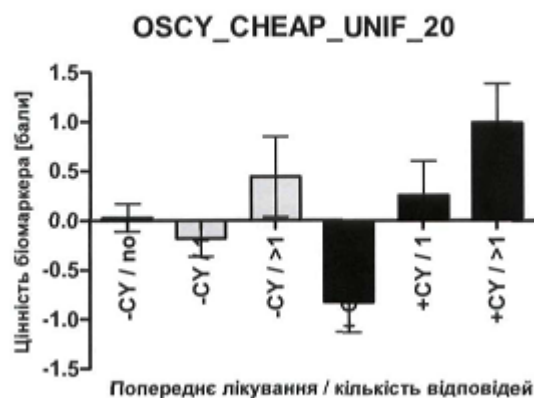
B



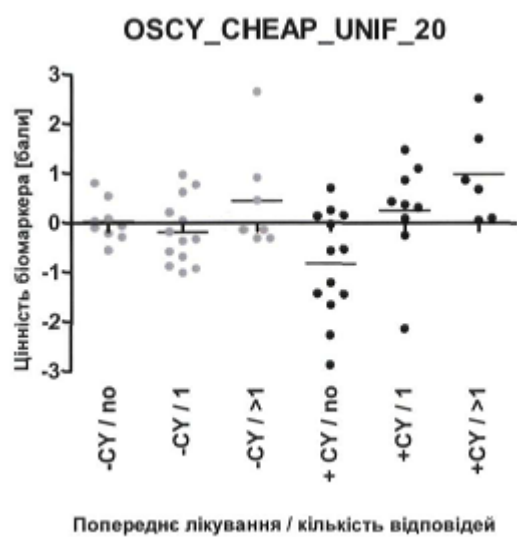
High = високий; low = низький

Фігура 6

A



B



Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601