



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110119** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)**C12N 15/09** (2006.01)**C07K 7/06** (2006.01)**C07K 7/08** (2006.01)**A61K 38/08** (2006.01)**A61K 38/10** (2006.01)**A61K 39/00****A61P 35/00****A61P 37/04** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2013 07324	(72) Винахідник(и): Накамура Юсуке (JP), Цунода Такуя (JP), Осава Рюдзі (JP), Йосімура Сатіко (JP), Ватанабе Томохіса (JP), Накаяма Гаку (JP)
(22) Дата подання заявки: 25.11.2011	(73) Власник(и): ОНКОТЕРАПІ САЕНС, ІНК., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012, Japan (JP)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.11.2015	(74) Представник: Войтенко Олександр Петрович, реєстр. №23
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/419,181	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007/013576 A1, 01.02.2007
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 02.12.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 27.08.2013, Бюл.№ 16	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2015, Бюл.№ 22	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/JP2011/006551, 25.11.2011	

(54) ПЕПТИДИ ТОММ34 ТА ВАКЦИНИ, ЩО ЇХ МІСТЯТЬ**(57) Реферат:**

Цим винаходом пропонується виділений пептид з менше ніж 15 амінокислот, де пептид вибраний з групи, що складається з наступних (а) та (b): (а) виділений пептид, який включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, та (b) виділений пептид, який включає амінокислотну послідовність, в якій одна або дві амінокислоти заміщені або додані до амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, щоб одержати модифікований пептид, який має здатність індукувати цитотоксичний Т-лімфоцит (CTL). Цим винаходом також пропонується фармацевтичні композиції, що містять такий пептид. Пептид за цим винаходом може використовуватися для лікування раку.

UA 110119 C2

Галузь техніки

Цей винахід стосується галузі біологічної науки, більш специфічно галузі лікування раку. Зокрема, цей винахід стосується новітніх пептидів, які є надзвичайно ефективними як протиракові вакцини, та ліків для лікування та профілактики пухлин.

5 Пріоритет

Для цієї заявки заявляється пріоритет за попередньою заявкою США № 61/419,181, поданою 2 грудня 2010 р., увесь зміст якої включено у цей опис шляхом посилання.

Попередній рівень техніки

10 Було продемонстровано, що CD8-позитивні CTL розпізнають епітопні пептиди, які походять від пухлиноасоційованих антигенів (ТАА), присутніх на молекулах головного комплексу гістосумісності (МНС) класу I, та в подальшому вбивають пухлинні клітини. З моменту відкриття родини антигенів меланоми (MAGE) як першого прикладу ТАА багато інших ТАА відкрили, застосовуючи імунологічні підходи (NPL 1, 2), та деякі з цих ТАА у цей час знаходяться у процесі клінічної розробки як імунотерапевтичні мішені.

15 Сприятливий, як мішень для імунотерапії, ТАА є обов'язковим для проліферації та виживання ракових клітин, тому що використання такого ТАА може мінімізувати добре описаний ризик уникнення імунної реакції раковими клітинами, зумовлений делецією, мутацією або даун-регуляцією ТАА, внаслідок терапевтично отриманої імунної селекції. Отже, визначення нових ТАА, спроможних індукувати сильні та специфічні протипухлинні імунні реакції, гарантує подальший розвиток; та, таким чином, клінічне застосування стратегій пептидної вакцинації для різних типів раку триває (NPL від 3 до 10). На сьогодні повідомлялося про декілька клінічних випробувань із застосуванням цих пептидів, що походять від ТАА. На жаль, багато з сучасних випробувань протиракових вакцин продемонстрували лише низький об'єктивний рівень реакцій (NPL від 11 до 13). Отже, все ще залишається потреба у нових ТАА як імунотерапевтичних мішеней.

25 Ген TOMM34, (GenBank Accession No: NM_006809), транслоказа зовнішньої мітохондріальної мембрани 34, був ідентифікований за допомогою баз даних EST та кДНК людини та був передбачений як такий, що кодує протеїнвімісні дегенеровані тетракопептидні повторювані (TPR) мотиви (NPL 14). Білок, що кодується цим геном, залучається до імпорту білків-попередників у мітохондрії. Цей білок має активність, подібну до супроводжувальної активності, зв'язуючи зрілу частину розгорнутих білків та сприяючи їх імпорту у мітохондрії (NPL 15).

35 У нещодавніх дослідженнях шляхом аналізу профілю генної експресії із застосуванням мікрочипа кДНК, що складається з 23040 генів, було показано, що TOMM34 часто регулюється на підвищення його вмісту при колоректальному раку. Крім того, викликаний за допомогою міРНК (малої інтерферуючої РНК (siRNA)) нокдаун TOMM34 у клітинній лінії раку товстої кишки послаблює зростання клітин раку товстої кишки (NPL 16).

Перелік літератури

Патентна література

40 [PTL 1] PCT/JP2006/314947

Непатентна література

- [NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993, 54(2): 177-80
 [NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996, 183(3): 725-9
 [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88(20): 1442-55
 45 [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999, 59(13): 3134-42
 [NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999, 59(21): 5554-9
 [NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996, 156(9): 3308-14
 [NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997, 57(20): 4465-8
 [NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999, 80(2): 169-72
 50 [NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81(3): 459-66
 [NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999, 81(3): 387-94
 [NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002, 20(20): 4169-80
 [NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002, 188: 33-42
 [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10(9): 909-15
 55 [NPL 14] Nuttal SD et al., DNA Cell Biol. 1997 Sep;16(9):1067-74
 [NPL 15] Mukhopadhyay A et al., Arch Biochem Biophys. 2002 Apr 1;400(1):97-104
 [NPL 16] Shimokawa et al., Int J Oncol. 2006 Aug;29(2):381-6

Суть винаходу

60 Цей винахід базується, принаймні частково, на відкритті новітніх пептидів, що можуть слугувати як придатні мішені імунотерапії. Оскільки ТАА зазвичай сприймаються імунною

системою як "свої" та внаслідок цього часто не мають імуногенності, то відкриття відповідних мішеней є надзвичайно важливим. Як вказувалося вище, TOMM34 (наприклад, SEQ ID NO: 41 та 42, також вказані в GenBank Accession No. NM_006809) був ідентифікований як регульований на підвищення його вмісту у різних видах раку, включаючи, проте не обмежуючись ними, гострий мієлогенний лейкоз (AML), хронічний мієлолейкоз (CML), рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, дрібноклітинний рак легеня (SCLC), недрібноклітинний рак легеня (NSCLC) та пухлину м'якої тканини. Таким чином, цей винахід зосереджується на TOMM34 як на придатному маркері раку та як на кандидаті у мішені імунотерапії.

У відповідності з цим винаходом були ідентифіковані специфічні епітопні пептиди генних продуктів TOMM34, які мають здатність індукувати CTL, специфічні до TOMM34. Як обговорюється докладніше далі, моноклеари периферійної крові (PBMC), узяті від здорового донора, стимулювали із застосуванням пептидів-кандидатів, які зв'язуються з HLA-A*0201 та які походять від TOMM34. Лінії CTL потім отримали зі специфічною цитотоксичністю проти HLA-A2-позитивних клітин-мішеней, мічених кожним з пептидів-кандидатів. Наведені у цьому описі результати демонструють, що ці пептиди являють собою HLA-A2-обмежені епітопні пептиди, які можуть індукувати сильні та специфічні імунні реакції проти клітин, що експресують TOMM34. Ці результати, крім того, вказують, що TOMM34 є дуже імуногенним, та що його епітопи є ефективними мішенями для протипухлинної імунотерапії.

Отже, метою цього винаходу є отримання виділених пептидів, які зв'язуються з антигеном HLA та включають амінокислотну послідовність TOMM34 (SEQ ID NO: 42) або їх імунологічно активні фрагменти. Очікується, що ці пептиди мають здатність до індукування CTL та, отже, їх можна застосовувати для індукування CTL *in vitro* або *ex vivo* або їх можна вводити суб'єктові для індукування імунних реакцій проти різних видів раку, приклади яких включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини. Переважними цими пептидами є нонапептиди або декапептиди, а більш переважними є нонапептид або декапептид, що складається з амінокислотної послідовності, вибраної серед SEQ ID NO: від 1 до 20 та від 22 до 40. Згідно з цим, пептиди, які мають амінокислотну послідовність, вибрану серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, показали особливо сильну спроможність індукувати CTL і, отже, є особливо переважними.

Цей винахід також передбачає модифіковані пептиди, які мають амінокислотну послідовність імунологічно активного фрагмента TOMM34, у якій одна, дві або більше амінокислот заміщені, видалені, вставлені або додані, доки модифіковані пептиди зберігають необхідну спроможність оригінального немодифікованого пептиду індукувати CTL. Стосовно цього, пептид, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, 5, 31 або 32, в якій одна, дві або більше амінокислот заміщені, видалені, вставлені або додані, є особливо переважним.

Цей винахід, крім того, охоплює виділені поліпептиди, які кодують будь-які пептиди цього винаходу. Ці поліпептиди можна застосовувати для індукування або приготування антиген-презентуючих клітин (APC) зі здатністю індукувати CTL. Подібно до вищеописаних пептидів цього винаходу, такі антиген-презентуючі клітини можна вводити суб'єктові для індукування імунних реакцій проти різних видів раку.

Коли їх вводять суб'єктові, тоді пептиди цього винаходу є присутніми на поверхні APC, так щоб індукувати CTL, які націлені на відповідні пептиди. Отже, однією з цілей цього винаходу є отримання композицій або агентів, які містять будь-які пептиди або поліпептиди, що забезпечуються цим винаходом для індукування CTL. Такі композиції або агенти, що містять будь-які пептиди або поліпептиди, можна застосовувати для лікування та/або профілактики різних видів раку або для попередження післяопераційного рецидиву раку, приклади яких включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини та/або попередження їх післяопераційного рецидиву.

Цим винаходом також передбачаються фармацевтичні агенти або композиції, що включають або містять один або більше пептидів або поліпептидів цього винаходу, виготовлених для лікування та/або профілактики раку, зокрема первинного раку, або для попередження його післяопераційного рецидиву. Замість або на додаток до пептидів або поліпептидів цього винаходу, представлені фармацевтичні агенти або композиції можуть включати як активні інгредієнти APC або екзосоми, які презентують будь-які з пептидів цього винаходу.

Пептиди або поліпептиди цього винаходу можна застосовувати для індукування APC, які

презентують на їх поверхні комплекс антигену HLA та пептиду цього винаходу, наприклад, внаслідок контактування APC, що походять від суб'єкта, з пептидом або внаслідок введення полінуклеотиду, що кодує пептид цього винаходу, в APC. Такі APC мають високу спроможність індукувати CTL проти пептидів-мішеней та є корисними для імунотерапії раку. Отже, цим винаходом передбачаються як способи індукування APC зі здатністю індукування CTL, так і APC, отримані за такими способами.

Ще однією метою цього винаходу є забезпечення способами індукування CTL, при цьому такі способи включають етап спільного культивування CD8-позитивних клітин з APC або екзосомами, які презентують пептид цього винаходу на їх поверхні, або етап введення полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують поліпептиди субодиниці рецептора Т-клітин (TCR), де TCR, утворений такими поліпептидами субодиниці, здатний зв'язуватися з комплексом антигену HLA та пептиду цього винаходу на клітинній поверхні. CTL, отримані за такими способами, є корисними в лікуванні та профілактиці різних видів раку, приклади яких включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини.

Ще однією метою цього винаходу є забезпечення виділеними антиген-презентуючими клітинами, що презентують на поверхні комплекс антигену HLA та пептиду цього винаходу.

Цим винаходом далі пропонуються виділені CTL, які націлені на пептиди цього винаходу. Ці APC та CTL можуть бути застосовані для імунотерапії раку.

Ще однією метою цього винаходу є забезпечення способами індукування імунної реакції проти раку у суб'єкта, що потребує цього, при цьому такі способи включають етап введення суб'єктові композиції або агента, що містить один або більше пептидів цього винаходу, полінуклеотиди, що кодують пептиди цього винаходу, або екзосоми, або APC, що презентують пептиди цього винаходу.

Можливість застосовувати цей винахід поширюється на будь-який ряд захворювань, пов'язаних з надмірною експресією TOMM34 або виникаючих внаслідок надмірної експресії TOMM34, таких як рак; приклади різних видів раку включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини.

Більш специфічно, цим винаходом пропонується наступне від [1] до [20].

[1] Виділений пептид за наступним (а) або (b):

(а) виділений пептид, який включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32;

(b) виділений пептид, який включає амінокислотну послідовність, в якій одна, дві або декілька амінокислот заміщені, видалені, вставлені або додані до амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, щоб одержати модифікований пептид, який зберігає здатність зв'язуватися з антигеном HLA та індукувати цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL).

[2] Виділений пептид за [1], де антиген HLA являє собою HLA-A2.

[3] Виділений пептид за [1] або [2], де згаданий пептид являє собою нонапептид або декапептид.

[4] Пептид за будь-яким одним від [1] до [3], який має принаймні одне заміщення, вибране з групи, що складається з наступних характеристик:

(а) друга амінокислота від N-кінця являє собою або є модифікованою так, щоб бути амінокислотою, вибраною з групи, що складається з лейцину та метіоніну; та

(b) амінокислота на C-кінці являє собою або є модифікованою так, щоб бути амінокислотою, вибраною з групи, що складається з валіну та лейцину.

[5] Виділений полінуклеотид, що кодує пептид за будь-яким одним від [1] до [4].

[6] Композиція для індукування CTL, де ця композиція містить один або більше пептидів за будь-яким одним від [1] до [4] або один або більше полінуклеотидів за [5].

[7] Фармацевтична композиція, яка містить:

(а) один або більше пептидів за будь-яким одним від [1] до [4];

(b) один або більше полінуклеотидів за [5];

(c) одну або більше антиген-презентуючих клітин (APC) або екзосом, що презентують комплекс пептиду за будь-яким одним від [1] до [4] та антигену HLA на своїй поверхні; або

(d) один або більше CTL, що розпізнають клітину, що презентує комплекс пептиду за будь-яким одним від [1] до [4] та антигену HLA на своїй поверхні,

в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм,

виготовлена для цілей, вибраних з групи, що складається з:

- (i) лікування існуючого раку,
- (ii) профілактики раку,
- (iii) попередження післяопераційного рецидиву раку та
- (iv) їх комбінацій.

[8] Фармацевтична композиція за [7], яка виготовлена для введення суб'єктові, антиген HLA якого являє собою HLA-A2.

[9] Спосіб індукування антиген-презентуючої клітини (APC) зі здатністю індукувати CTL, який включає етап, вибраний з групи, що складається з:

(a) контактування APC з пептидом за будь-яким одним від [1] до [4] *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo* та

(b) введення полінуклеотиду, що кодує пептид за будь-яким одним від [1] до [4], у APC.

[10] Спосіб індукування CTL, який включає етап, вибраний з групи, що складається з:

(a) спільного культивування CD8-позитивної Т-клітини та APC, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким одним від [1] до [4];

(b) спільного культивування CD8-позитивної Т-клітини та екзосоми, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким одним від [1] до [4]; та

(c) введення у Т-клітину полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують поліпептиди субодиниці рецептора Т-клітин (TCR), де TCR, утворений згаданими поліпептидами субодиниці TCR, здатний зв'язуватися з комплексом антигену HLA та пептиду за будь-яким одним від [1] до [4] на клітинній поверхні.

[11] Виділена APC, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким одним від [1] до [4].

[12] APC за [11], індукована за способом індукування антиген-презентуючої клітини (APC) зі здатністю індукувати CTL, при цьому спосіб включає етап, вибраний з групи, що складається з:

(a) контактування APC з пептидом за будь-яким одним від [1] до [4] *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo* та

(b) введення полінуклеотиду, що кодує пептид за будь-яким одним від [1] до [4], у APC.

[13] Виділений CTL, який націлений на будь-який з пептидів від [1] до [4].

[14] CTL за [13], індукований за способом індукування CTL, при цьому спосіб включає етап, вибраний з групи, що складається з:

(a) спільного культивування CD8-позитивної Т-клітини та APC, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким одним від [1] до [4];

(b) спільного культивування CD8-позитивної Т-клітини та екзосоми, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким одним від [1] до [4]; та

(c) введення у Т-клітину полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують поліпептиди субодиниці рецептора Т-клітин (TCR), де TCR, утворений згаданими поліпептидами субодиниці TCR, здатний зв'язуватися з комплексом антигену HLA та пептиду за будь-яким одним від [1] до [4] на клітинній поверхні.

[15] Спосіб індукування імунної реакції проти раку у суб'єкта, який включає етап введення суб'єктові пептиду за [1] - [4], його імунологічно активного фрагмента або полінуклеотиду, що кодує цей пептид або фрагмент.

[16] Вектор, який включає нуклеотидну послідовність, що кодує пептид за будь-яким одним від [1] до [4].

[17] Клітина-хазяїн, трансформована або трансфектована вектором експресії за [16].

[18] Екзосома, яка презентує комплекс, що включає пептид за будь-яким одним від [1] до [4] та антиген HLA.

[19] Антитіло або його імунологічно активний фрагмент проти пептиду за будь-яким одним від [1] до [4].

[20] Діагностичний набір, який включає пептид за будь-яким одним від [1] до [4], полінуклеотид за [5] або антитіло або імунологічно активний фрагмент за [19].

Об'єкти та ознаки цього винаходу стануть більш повно зрозумілими, коли буде прочитано наступний докладний опис у зв'язку з ілюстративним матеріалом та прикладами, що його супроводжують. Це слід розуміти, що як вищеописана суть цього винаходу, так і наступний докладний опис наводять приклади варіантів здійснення цього винаходу, але вони не обмежують цей винахід або інші альтернативні варіанти здійснення цього винаходу. Зокрема, незважаючи на те, що винахід описується у цьому описі винаходу з посиланням на ряд специфічних варіантів здійснення, буде зрозумілим, що опис ілюструє винахід, та його не було створено як обмеження винаходу. Різні модифікації та варіанти застосування можуть виникнути у фахівців у цій галузі, при цьому вони не будуть суперечити духу та обсягу винаходу, як

описано у формулі винаходу, що додається. Подібно до цього інші цілі, ознаки, користь та переваги цього винаходу будуть очевидними, виходячи з цієї суті та певних варіантів здійснення, описаних далі, та їх легко зрозуміють фахівці у цій галузі. Такі цілі, ознаки, користь та переваги будуть очевидними, виходячи з вищевказаного у зв'язку з супроводжувальними прикладами, даними, ілюстративним матеріалом та усіма обґрунтованими висновками, що з них виходять, самостійно або з урахуванням посилань, включених в цей опис.

Стислий опис ілюстративного матеріалу

Різні аспекти та варіанти застосування цього винаходу будуть очевидними для фахівців у цій галузі після вивчення стислого опису ілюстративного матеріалу та докладного опису цього винаходу та його переважних варіантів здійснення, які наведено далі.

Фіг. 1.

Фігура 1 складається з ряду фотографій, від (а) до (е), на яких зображено результати імуноферментного спот-аналізу (ELISPOT) виробництва IFN-гамма на CTL, які індукували пептидами, що походять від TOMM34. Ці CTL у комірці номер # 4 з TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) (а), у комірці номер # 2 з TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5) (b), у комірці номер # 4 з TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) (c) та у комірці номер # 2 з TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32) (d) демонстрували сильне виробництво IFN-гамма, порівняно з контрольним, відповідно. Квадрат на комірці цих фотографій вказує на те, що клітини з відповідної комірки розмножувалися, запровадивши лінії CTL. На відміну від цього, як звичайний випадок негативних даних, не було продемонстровано специфічного виробництва IFN-гамма від CTL, стимульованого TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO: 21) (е), не показано. На фігурах "+" вказує на виробництво IFN-гамма проти клітин-мішеней, мічених відповідним пептидом, та "-" вказує на виробництво IFN-гамма проти клітин-мішеней, не мічених будь-якими пептидами.

Фіг. 2.

Фігура 2 представляє лінійний графік, на якому зображено виробництво IFN-гамма лінією CTL, стимульованою за допомогою TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1). Кількість IFN-гамма, виробленого CTL, була виміряна за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Результати показують, що лінія CTL, отримана внаслідок стимуляції цим пептидом, демонструє сильне виробництво IFN-гамма порівняно з контрольним. На фігурах "+" вказує на виробництво IFN-гамма проти клітин-мішеней, мічених відповідним пептидом, та "-" вказує на виробництво IFN-гамма проти клітин-мішеней, не мічених будь-якими пептидами.

Фіг. 3.

Фігура 3 представляє лінійний графік, на якому зображено виробництво IFN-гамма клоном CTL, отриманим внаслідок обмежувального розведення від лінії CTL, стимульованої за допомогою TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1). Результати показують, що клон CTL, отриманий внаслідок стимуляції цим пептидом, демонструє сильне виробництво IFN-гамма порівняно з контрольним. На фігурі "+" вказує на виробництво IFN-гамма проти клітин-мішеней, мічених підходящим пептидом, та "-" вказує на виробництво IFN-гамма проти клітин-мішеней, не мічених будь-якими пептидами.

Фіг. 4.

Фігура 4 представляє лінійний графік, на якому зображено специфічну активність CTL проти клітин-мішеней, які експресують TOMM34 та HLA-A*0201. COS7-клітини, трансфектовані HLA-A*0201 або геном TOMM34 повної довжини, отримали як контрольні. Лінія CTL, отримана за допомогою TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1), демонструвала специфічну CTL-активність проти COS7-клітин, трансфектованих як TOMM34, так і HLA-A*0201 (чорний ромб). З іншого боку, значущої специфічної CTL-активності не виявили проти клітин-мішеней, що експресують або HLA-A*0201 (трикутник), або TOMM34 (білий круг).

Опис варіантів здійснення

Незважаючи на те, що будь-які способи та матеріали, подібні або еквівалентні тим, що описані у цьому описі винаходу, можна застосовувати на практиці або під час тестування варіантів здійснення цього винаходу, зараз будуть описані переважні способи, пристрої та матеріали. Проте, до того, як буде описано ці матеріали та способи, слід зрозуміти, що ці описи мають ілюстративний характер, та вони не призначені для обмеження цього винаходу. Слід також розуміти, що цей винахід не обмежується описаними у цьому описі винаходу певними розмірами, формами, вимірами, матеріалами, методологією, протоколами тощо, оскільки вони можуть варіюватися залежно від поточних експериментів та оптимізації. Крім того, термінологія, що застосовується в описі, призначена для описування тільки певних варіантів або варіантів здійснення, проте вона не призначена для обмеження обсягу цього винаходу, який буде обмежено тільки формулою винаходу, що додається.

Всі публікації, патенти або патентні заявки, згадані у цьому описі винаходу, особливо

включено до цього опису у своєму повному обсязі шляхом посилання. Проте, нічого в цьому описі винаходу не слід тлумачити як припущення, що цей винахід не має права передувати такому змісту завдяки пріоритету винаходу.

I. Визначення

Якщо не визначено іншим чином, усі технічні та наукові терміни, що застосовуються у цьому описі мають таке саме значення, яке є звичайно зрозумілим для звичайного фахівця у цій галузі, до якої належить цей винахід. У випадку конфлікту цей опис винаходу, включаючи визначення, буде це регулювати. Крім того, матеріали, способи та приклади мають лише ілюстративний характер, та вони не призначені для обмеження.

Артикли "a", "an" та "the", як застосовуються у цьому описі винаходу, означають "принаймні один", якщо на інше особливо не вказано.

Терміни "виділений" та "очищений", що застосовуються стосовно речовини (наприклад, пептиду, антитіла, полінуклеотиду тощо), вказують на те, що речовина є по суті вільною від принаймні однієї речовини, яка також може бути включеною у природне джерело. Отже, термін "виділений" або "очищений" пептид відноситься до пептиду, що є по суті вільним від клітинного матеріалу, такого як вуглевод, ліпід або інші забруднювальні білки, від клітинного або тканинного джерела, з якого походить пептид, або є по суті вільним від хімічних попередників або інших хімічних речовин, коли його отримують шляхом хімічного синтезу. Термін "по суті вільний від клітинного матеріалу" включає препарати пептиду, у яких пептид відокремлений від клітинних компонентів клітин, з яких його виділено або отримано за допомогою рекомбінантних способів. Отже, пептид, який є по суті вільним від клітинного матеріалу, включає препарати поліпептиду, які мають менш ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (від сухої маси) гетерологічного білка (також називається у цьому описі "забруднювальний білок"). Коли пептид отримують за допомогою рекомбінантних способів, тоді він також є переважно по суті вільним від культурального середовища, та він включає препарати пептиду з культуральним середовищем менш ніж приблизно 20 %, 10 % або 5 % від об'єму препарату пептиду. Коли пептид отримують шляхом хімічного синтезу, тоді він є переважно по суті вільним від хімічних попередників або інших хімічних речовин, та він включає препарати пептиду з хімічними попередниками або іншими хімічними речовинами, залученими у синтез пептиду, менш ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (сухої маси) від об'єму препарату пептиду. Те, що певний препарат пептиду містить виділений або очищений пептид, можна продемонструвати, наприклад, шляхом виявлення єдиної смуги після електрофорезу препарату пептиду із застосуванням поліакриламідного гелю з додецилсульфатом натрію (SDS) або шляхом забарвлення Coomassie Brilliant Blue або йому подібним гелем. У переважному варіанті здійснення пептиди та полінуклеотиди цього винаходу є виділеними або очищеними.

Терміни "поліпептид", "пептид" та "білок" застосовуються у цьому описі винаходу як взаємозамінні для позначення полімеру з амінокислотних залишків. Терміни застосовуються до амінокислотних полімерів, у яких один або більше амінокислотних залишків є модифікованими залишками або залишками неприродного походження, такими як штучний хімічний міметик відповідних амінокислот природного походження, а також до амінокислотних полімерів природного походження.

Термін "олігопептид", що іноді застосовується у цьому описі винаходу, застосовується для позначення пептидів цього винаходу, довжина яких становить 20 залишків або менше, зазвичай 15 залишків або менше, та які зазвичай складаються з приблизно 8-11 залишків, часто з 9 або 10 залишків.

Термін "амінокислота", як застосовується у цьому описі винаходу, означає природні та синтетичні амінокислоти, а також амінокислотні аналоги та амінокислотні міметики, які функціонують подібно до амінокислот природного походження. Амінокислота може бути або L-амінокислотою, або D-амінокислотою. Амінокислоти природного походження - це ті амінокислоти, що кодуються генетичним кодом, а також ті амінокислоти, що модифікуються після трансляції у клітинах (наприклад, гідроксипролін, гамма-карбоксиглутамат та O-фосфосерин). Фраза "амінокислотний аналог" означає сполуки, які мають таку саму основну хімічну структуру (альфа-вуглецевий зв'язок з воднем, карбоксильна група, аміногрупа та R-група), що і амінокислота природного походження, проте мають модифіковану R-групу або модифіковані каркаси (наприклад, гомосерин, норлейцин, метіонін, сульфоксид, метіонін метилсульфоній). Фраза "амінокислотний міметик" означає хімічні сполуки, які мають відмінні структури, проте подібні функції, що і звичайні амінокислоти.

Амінокислоти можуть бути позначені у цьому описі винаходу їхніми загально відомими трилітерними символами або однолітерними символами, рекомендованими IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Терміни "ген", "полінуклеотиди" та "нуклеїнові кислоти" застосовуються у цьому описі винаходу як взаємозамінні та, якщо інше особливо не вказується, подібно до амінокислот, позначаються своїми зазвичай прийнятими однолітерними кодами.

Термін "композиція", як застосовується у цьому описі винаходу, призначений для охоплення продукту, що містить специфіковані інгредієнти у специфікованій кількості, а також будь-який продукт, що є результатом, безпосередньо або опосередковано, комбінації специфікованих інгредієнтів у специфікованій кількості. Такий термін у зв'язку з "фармацевтичною композицією" призначений для того, щоб охоплювати продукт, що включає активний інгредієнт (інгредієнти) та будь-який інертний інгредієнт (інгредієнти), що складає (складають) носій, а також будь-який продукт, що є результатом, безпосередньо або опосередковано, комбінації, комплексоутворення або агрегації будь-яких двох або більше інгредієнтів, або результатом дисоціації одного або більше інгредієнтів, або результатом інших типів реакцій або взаємодій одного або більше інгредієнтів. Отже, у контексті цього винаходу цей термін "фармацевтична композиція" означає будь-яку композицію, отриману внаслідок змішування сполуки або речовини цього винаходу та фармацевтично або фізіологічно прийнятного носія.

Фраза "фармацевтично прийнятний носій" або "фізіологічно прийнятний носій", як застосовується у цьому описі винаходу, означає фармацевтично або фізіологічно прийнятний матеріал, композицію, речовину, сполуку або наповнювач, включаючи, проте не обмежуючись ними, рідкий або твердий наповнювач, розріджувач, ексципієнт, розчинник або інкапсувальний матеріал.

Термін "активний інгредієнт" у цьому описі винаходу означає речовину в композиції, яка є біологічно або фізіологічно активною. Зокрема, у контексті фармацевтичної композиції термін "активний інгредієнт" означає речовину, яка демонструє об'єктивний фармакологічний ефект. Наприклад, у випадку фармацевтичних композицій для застосування під час лікування або профілактики раку активні інгредієнти в композиціях можуть спричиняти безпосередньо або опосередковано принаймні одну біологічну або фізіологічну дію на ракові клітини та/або тканини. Переважно, така дія може включати зменшення або інгібування росту ракових клітин, руйнування або вбивання ракових клітин та/або тканин тощо. Звичайно, непрямий ефект активних інгредієнтів - це індукція CTL, які розпізнають або вбивають ракові клітини. До початку включення до складу "активний інгредієнт" може також називатися "діюче начало", "лікарська речовина" або "технічний продукт".

Якщо не визначено іншим чином, термін "рак" означає різні види раку, які надмірно експресують ген TOMM34, приклади яких включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини.

Якщо не визначено іншим чином, терміни "цитотоксичний Т-лімфоцит", "цитотоксична Т-клітина" та "CTL" застосовуються у цьому описі винаходу як взаємозамінні, та, якщо інше особливо не вказано, означають підгрупу Т-лімфоцитів, які є спроможними розпізнавати сторонні клітини (наприклад, пухлинні клітини, інфіковані вірусом клітини) та спричиняти загибель таких клітин.

Якщо не визначено іншим чином, терміни "HLA-A2" відносяться до типу HLA-A2, що включає підтипи, приклади яких включають, проте не обмежуються ними, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 і HLA-A*0250.

Якщо не визначено іншим чином, термін "набір", як застосовується у цьому описі винаходу, застосовується для позначення комбінації реагентів або інших матеріалів. У цьому описі винаходу передбачається, що набір може включати мікроматрицю, чип, маркер тощо. Термін "набір" не слід обмежувати певною комбінацією реагентів та/або матеріалів.

Як застосовується у цьому описі винаходу, у контексті суб'єкта або пацієнта, фраза "антиген HLA-A2 суб'єкта (або пацієнта)" означає, що суб'єкт або пацієнт гомозиготним або гетерозиготним чином має антигенний ген HLA-A2 як молекулу MCH (головного комплексу гістосумісності) класу I, а антиген HLA-A2 експресується у клітинах суб'єкта або пацієнта як антиген HLA.

Доки способи та композиції цього винаходу знаходять застосування у контексті "лікування" раку, лікування вважається "ефективним", якщо його наслідком є клінічна користь, така як зменшення експресії гена TOMM34 або зменшення розміру, розповсюдження або метастатичного потенціалу раку у суб'єкта. Коли лікування застосовують з метою профілактики, тоді "ефективність" означає, що воно уповільнює або попереджає утворення раку, або попереджає або усуває клінічні симптоми раку. Ефективність визначається за будь-яким

відомим способом діагностування або лікування пухлин певного типу.

Доки способи та композиції цього винаходу знаходять застосування у контексті "попередження" та "профілактики" раку, такі терміни застосовуються у цьому описі винаходу як взаємозамінні та означають будь-яку активність, внаслідок якої зменшується тягар смертності або ускладнення від хвороби. Попередження та профілактика можуть виникати "на первинному, вторинному та третинному рівнях попередження". У той час, коли первинний рівень попередження та профілактики дозволить уникнути розвитку хвороби, тоді вторинний та третинний рівні попередження та профілактики охоплюють типи активності, спрямовані на попередження та профілактику розвитку хвороби та виникнення симптомів, а також на зменшення негативного впливу хвороби, яка вже виникла, внаслідок відновлення функції та зменшення пов'язаних з хворобою ускладнень. Альтернативно, попередження та профілактика можуть включати широкий діапазон профілактичної терапії, спрямованої на усунення суворості певного розладу, наприклад, на зменшення проліферації та метастазу пухлин.

У контексті цього винаходу лікування та/або профілактика раку та/або попередження післяопераційного рецидиву раку включають будь-які з наступних етапів, такі як хірургічне видалення ракових клітин, інгібування росту ракових клітин, інволюція або регресія пухлини, індукція ремісії та пригнічення випадків раку, регресія пухлини та зменшення або інгібування метастазу. Ефективне лікування та/або профілактика раку знижує смертність та покращує прогноз окремих людей, що страждають на рак, зменшує рівні маркерів пухлин у крові та усуває помітні симптоми, що супроводжують рак. Наприклад, зменшення або покращення симптомів складають ефективне лікування та/або профілактику, та включають зменшення симптомів на 10 %, 20 %, 30 % або більше або стабілізацію перебігу хвороби.

У контексті цього винаходу термін "антитіло" означає імуноглобуліни та їх фрагменти, які специфічно реагують на призначений білок або його пептид. Антитіло може включати антитіла людини, антитіла приматів, химерні антитіла, біспецифічні антитіла, гуманізовані антитіла, антитіла, злиті з іншими білками або радіомітками, та фрагменти антитіл. Крім того, "антитіло" у цьому описі винаходу застосовується у найширшому сенсі та специфічно охоплює непошкоджені моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, багатоспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), утворені з принаймні двох непошкоджених антитіл, та фрагменти антитіл, доки вони демонструють бажану біологічну активність. "Антитіло" вказує на всі класи (наприклад, IgA, IgD, IgE, IgG і IgM).

Якщо не вказано інше, усі технічні та наукові терміни, що застосовуються у цьому описі винаходу, мають ті самі значення, які є зазвичай зрозумілими для звичайних фахівців у галузі, до якої належить цей винахід.

II. Пептиди

Пептиди цього винаходу, описані докладніше нижче, можуть бути позначені як пептид(и) TOMM34.

Для того, щоб продемонструвати, що пептиди, які походять від TOMM34, функціонують як антиген, що розпізнається CTL, пептиди, що походять від TOMM34 (SEQ ID NO: 42), проаналізували з метою визначення, чи були вони епітопами антигенів, обмеженими HLA-A2, які зазвичай вважаються HLA-алелями (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994).

Кандидатів HLA-A2-зв'язувальних пептидів, що походять від TOMM34, ідентифікували, використовуючи інформацію їхнього афінітету зв'язування з HLA-A2. Ідентифікували наступні пептиди-кандидати:

TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1),
 TOMM34-A02-9-77 (SEQ ID NO: 2),
 TOMM34-A02-9-52 (SEQ ID NO: 3),
 TOMM34-A02-9-110 (SEQ ID NO: 4),
 TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5),
 TOMM34-A02-9-230 (SEQ ID NO: 6),
 TOMM34-A02-9-103 (SEQ ID NO: 7),
 TOMM34-A02-9-80 (SEQ ID NO: 8),
 TOMM34-A02-9-255 (SEQ ID NO: 9),
 TOMM34-A02-9-23 (SEQ ID NO: 10),
 TOMM34-A02-9-195 (SEQ ID NO: 11),
 TOMM34-A02-9-111 (SEQ ID NO: 12),
 TOMM34-A02-9-238 (SEQ ID NO: 13),
 TOMM34-A02-9-1 (SEQ ID NO: 14),
 TOMM34-A02-9-113 (SEQ ID NO: 15),

TOMM34-A02-9-253 (SEQ ID NO: 16),
 TOMM34-A02-9-239 (SEQ ID NO: 17),
 TOMM34-A02-9-144 (SEQ ID NO: 18),
 TOMM34-A02-9-142 (SEQ ID NO: 19),
 TOMM34-A02-9-279 (SEQ ID NO: 20),
 TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO: 21),
 TOMM34-A02-10-97 (SEQ ID NO: 22),
 TOMM34-A02-10-79 (SEQ ID NO: 23),
 TOMM34-A02-10-237 (SEQ ID NO: 24),
 TOMM34-A02-10-135 (SEQ ID NO: 25),
 TOMM34-A02-10-219 (SEQ ID NO: 26),
 TOMM34-A02-10-238 (SEQ ID NO: 27),
 TOMM34-A02-10-127 (SEQ ID NO: 28),
 TOMM34-A02-10-113 (SEQ ID NO: 29),
 TOMM34-A02-10-241 (SEQ ID NO: 30),
 TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31),
 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32),
 TOMM34-A02-10-195 (SEQ ID NO: 33),
 TOMM34-A02-10-112 (SEQ ID NO: 34),
 TOMM34-A02-10-194 (SEQ ID NO: 35),
 TOMM34-A02-10-299 (SEQ ID NO: 36),
 TOMM34-A02-10-141 (SEQ ID NO: 37),
 TOMM34-A02-10-160 (SEQ ID NO: 38),
 TOMM34-A02-10-175 (SEQ ID NO: 39) та
 TOMM34-A02-10-186 (SEQ ID NO: 40).

Крім того, після стимулювання *in vitro* Т-клітин дендритними клітинами (DC), навантаженими цими пептидами, успішно отримали CTL, використовуючи кожний з наступних пептидів:

TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1),
 TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5),
 TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) та
 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32).

Ці отримані CTL продемонстрували сильну специфічну CTL-активність проти клітин-мішеней, мічених відповідними пептидами. Результати, представлені тут, демонструють, що TOMM34 являє собою антиген, що розпізнається CTL, та що протестовані пептиди є епітопними пептидами TOMM34, обмеженого HLA-A2.

Оскільки ген TOMM34 надмірно експресується в ракових клітинах та тканинах, включаючи, проте не обмежуючись ними, клітини та тканини AML, CML, раку сечового міхура, раку молочної залози, раку шийки матки, колоректального раку, раку стравоходу, раку печінки, остеосаркоми, раку простати, раку нирки, SCLC, NSCLC та пухлини м'якої тканини, але не експресується у більшості здорових органів, то він є гарною мішенню для імунотерапії. Отже, цим винаходом пропонуються нонапептиди (пептиди, що складаються з дев'яти амінокислотних залишків) та декапептиди (пептиди, що складаються з десяти амінокислотних залишків) епітопів від TOMM34, що розпізнаються CTL. Альтернативно, цим винаходом пропонується виділений пептид, який зв'язується з антигеном HLA та індукує цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL), де цей пептид має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42 або є її імунологічно активним фрагментом. Специфічно, цим винаходом пропонуються пептиди, які включають амінокислотну послідовність, вибрану серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32. Більш специфічно, у деяких варіантах здійснення цим винаходом пропонуються пептиди, які складаються з амінокислотної послідовності, вибраної серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32.

Взагалі, програмне забезпечення, яке зараз є доступним, наприклад, в Інтернеті, таке, яке описано у Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75, можна застосовувати для розрахунку афінитету зв'язування між різними пептидами та антигенами HLA при комп'ютерному моделюванні експерименту. Афінитет зв'язування з антигенами HLA можна вимірити як описано, наприклад, у Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75, та Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007; 8: 424, та Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003. Способи визначення афінитету зв'язування описані, наприклад, в Journal of Immunological Methods 1995, 185: 181-190 і Protein Science 2000, 9: 1838-1846. Отже, будь-хто може легко застосовувати таке програмне забезпечення для вибору тих фрагментів, які походять від TOMM34 та які мають високий афінитет зв'язування з антигенами HLA. Відповідно, цей винахід охоплює пептиди, що складаються з будь-яких фрагментів, які походять від

ТОММ34, які мають високий афінитет зв'язування з антигенами HLA, визначений за допомогою таких відомих програм. Крім того, такі пептиди можуть включати послідовність ТОММ34 (SEQ ID NO: 42) повної довжини.

Пептиди цього винаходу, особливо нонапептиди та декапептиди цього винаходу, можна фланкувати додатковими амінокислотними залишками, доки пептид зберігає свою спроможність індукувати CTL. Особливі додаткові амінокислотні залишки можуть складатися з амінокислот будь-якого типу, доки вони не ослаблюють спроможність індукувати CTL оригінального пептиду. Отже, цей винахід охоплює пептиди, які мають афінитет зв'язування для антигенів HLA, зокрема, включаючи пептиди, що походять від ТОММ34. Такі пептиди являють собою, наприклад, менш ніж приблизно 40 амінокислот, часто менш ніж приблизно 20 амінокислот, зазвичай менш ніж приблизно 15, 14, 13, 12, 11 або 10 амінокислот.

Взагалі, відомо, що модифікації однієї, двох, декількох або більше амінокислот у пептиді не впливають на функцію пептиду або у деяких випадках навіть підсилюють бажану функцію оригінального білка. Фактично, відомо, що модифіковані пептиди (тобто, пептиди, що складаються з амінокислотної послідовності, модифікованої шляхом заміщення, видалення, вставлення або додавання одного, двох або декількох амінокислотних залишків до оригінальної контрольної послідовності) зберігають біологічну активність оригінального пептиду (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Отже, згідно з одним варіантом здійснення винаходу пептид, що має спроможність індукувати CTL цього винаходу, може складатися з пептиду, який складається з амінокислотної послідовності, вибраної серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, у яких одна, дві або навіть більше амінокислот додані, видалені, вставлені та/або заміщені.

Фахівець у цій галузі зрозуміє, що, внаслідок окремих модифікацій (тобто, видалень, вставок, додавань або заміщень) амінокислотної послідовності, які змінюють єдину амінокислоту або невеликий відсоток від загальної амінокислотної послідовності, зберігаються властивості бічного ланцюга оригінальної амінокислоти; отже, це називається "консервативним заміщенням" або "консервативною модифікацією", де внаслідок зміни білка утворюється білок з подібними функціями. Таблиці консервативних заміщень, які пропонують функціонально подібні амінокислоти, є добре відомими у цій галузі. Прикладами властивостей амінокислотних бічних ланцюгів є гідрофобні амінокислоти (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), гідрофільні амінокислоти (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), та бічні ланцюги, які мають наступні спільні функціональні групи або характеристики: аліфатичний бічний ланцюг (G, A, V, L, I, P); бічний ланцюг, що містить гідроксильну групу (S, T, Y); бічний ланцюг, що містить атом сірки (C, M); бічний ланцюг, що містить амід та карбонову кислоту (D, N, E, Q); бічний ланцюг, що містить основу (R, K, H), та бічний ланцюг, що містить ароматичну групу (H, F, Y, W). Крім того, наступні вісім груп, кожна з яких містить амінокислоти, є консервативними заміщеннями одного другим:

- 1) Аланін (A), Гліцин (G);
- 2) Аспарагінова кислота(D), Глутамінова кислота (E);
- 3) Аспарагін (N), Глутамін (Q);
- 4) Аргінін (R), Лізин (K);
- 5) Ізолейцин (I), Лейцин (L), Метіонін (M), Валін (V);
- 6) Фенілаланін (F), Тирозин (Y), Триптофан (W);
- 7) Серин (S), Треонін (T) та
- 8) Цитстеїн (C), Метіонін (M) (див., наприклад, Creighton, Proteins 1984).

Вважають, що такі консервативно модифіковані пептиди є також пептидами цього винаходу. Проте, пептид цього винаходу не обмежується ними та він може включати неконсервативні модифікації, доки отриманий модифікований пептид зберігає спроможність індукувати CTL оригінального немодифікованого пептиду. Крім того, модифіковані пептиди не виключають пептиди зі спроможністю індукувати CTL, які є пептидами поліморфних варіантів, міжвидових гомологів та алелей ТОММ34.

Амінокислотні залишки можна вставляти, заміщувати або додавати до пептидів цього винаходу, або, альтернативно, амінокислотні залишки можна з них видаляти, щоб досягти більш високого афінитету зв'язування. Для того, щоб зберегти необхідну спроможність індукувати CTL, переважно модифікують (наприклад, видаляють, вставляють, додають або заміщують) невелику кількість (наприклад, 1, 2 або декілька) або невеликий відсоток амінокислот. У цьому описі винаходу термін "декілька" означає 5 або менше амінокислот, наприклад, 3 або менше. Відсоток амінокислот, які слід модифікувати, може становити, 20 % або менше, наприклад, 15 % або менше, наприклад, 10 % або менше, наприклад, від 1 до 5 %.

Крім того, у цих пептидах можуть бути зроблені заміщення або додавання таких

амінокислотних залишків, щоб досягти вищого афінитету зв'язування. Коли ці пептиди застосовуються в імунотерапії, тоді вони можуть бути представлені на поверхні клітини або екзосоми як комплекс з антигеном HLA. Окрім пептидів, які природно виникають, оскільки закономірність послідовностей пептидів, що виникають внаслідок зв'язування з антигенами HLA, є вже відомою (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), можна вводити модифікації на основі такої закономірності в імуногенні пептиди цього винаходу.

Наприклад, пептиди, які мають високий афінитет зв'язування з HLA-A2, мають тенденцію, щоб їх друга амінокислота від N-кінця, була заміщена лейцином або метіоніном. Подібно до цього пептиди, у яких C-кінець заміщений валіном або лейцином, можна також переважно застосовувати. Відповідно, цим винаходом передбачаються пептиди, які мають амінокислотні послідовності, вибрані серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, в яких друга амінокислота від N-кінця амінокислотної послідовності згаданого SEQ ID NO заміщена лейцином або метіоніном, та/або, де C-кінець амінокислотної послідовності згаданого SEQ ID NO заміщений валіном або лейцином.

Заміщення можна вводити не тільки на кінцевих амінокислотах, але також на позиції можливого розпізнавання пептидів рецептором T-клітин (TCR). Декілька досліджень продемонстрували, що пептид з амінокислотними заміщеннями може бути еквівалентним або кращим за оригінал, наприклад, CAP1, p53 (264-272), Her-2/neu (369-377) або gp100 (209-217) (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002);168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 та S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

Цим винаходом також передбачається додавання однієї, двох або декількох амінокислот до N- та/або C-кінців пептидів цього винаходу. Такі модифіковані пептиди з високим афінитетом зв'язування з антигеном HLA та зі збереженою спроможністю індукувати CTL також включено до цього винаходу.

Наприклад, цим винаходом пропонується виділений пептид, який має довжину менш ніж 14, 13, 12, 11 або 10 амінокислот, який зв'язується з антигеном HLA, має спроможність індукувати CTL та який включає амінокислотну послідовність, вибрану серед:

- (i) амінокислотної послідовності, вибраної серед SEQ ID NO: 1 та 5;
- (ii) амінокислотної послідовності, у якій одна, дві або декілька амінокислот модифіковані в амінокислотній послідовності, вибраній серед SEQ ID NO: 1 та 5, та
- (iii) амінокислотної послідовності за (ii), де амінокислотна послідовність має одну або обидві з наступних характеристик:

(a) друга амінокислота від N-кінця згаданої SEQ ID NO вибрана серед лейцину та метіоніну; та

(b) амінокислота на C-кінці згаданої SEQ ID NO вибрана серед валіну та лейцину.

Крім того, цим винаходом також пропонується виділений пептид, який має довжину менш ніж 15, 14, 13, 12 або 11 амінокислот, який зв'язується з антигеном HLA, має спроможність індукувати CTL та який включає амінокислотну послідовність, вибрану серед:

- (i') амінокислотної послідовності, вибраної серед SEQ ID NO: 31 та 32;
- (ii') амінокислотної послідовності, у якій одна, дві або декілька амінокислот модифіковані в амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з SEQ ID NO: 31 та 32, та
- (iii') амінокислотної послідовності за (ii'), де амінокислотна послідовність має одну або обидві з наступних характеристик:

(a) друга амінокислота від N-кінця згаданої SEQ ID NO вибрана серед лейцину та метіоніну; та

(b) амінокислота на C-кінці згаданої SEQ ID NO вибрана серед валіну та лейцину.

Коли ці пептиди контактують з APC, тоді ці пептиди зв'язуються з антигенами HLA на APC, щоб бути представленими на APC як комплекси з антигенами HLA. Альтернативно, ці пептиди вводяться в APC та переробляються у фрагменти, які складаються з амінокислотної послідовності, вибраної серед (i)-(iii) та (i')-(iii'), в APC, щоб бути представленими на APC як комплекси з антигенами HLA. Отже, індукуються CTL, специфічні до таких пептидів.

Проте, коли пептидна послідовність є ідентичною до частини амінокислотної послідовності ендогенного або екзогенного білка, який має відмінну функцію, тоді можуть виникати побічні ефекти, такі як автоімунні розлади або алергічні симптоми проти специфічних речовин. Отже, можна виконати пошук гомології, застосовуючи доступні бази даних, щоб уникнути ситуацій, коли послідовність пептиду відповідає амінокислотній послідовності іншого білка. Коли з пошуків гомології стає очевидним, що існує неоднаковий пептид з різницею в 1 або 2 амінокислоти до цільового пептиду, тоді цільовий пептид можна модифікувати для підвищення

його афінитету зв'язування з антигенами HLA та/або підвищення його спроможності індукувати CTL без будь-якої загрози таких побічних ефектів.

Незважаючи на те, що очікується, що пептиди, які мають високий афінитет зв'язування з антигенами HLA, як описано вище, є надзвичайно ефективними, пептидів-кандидатів, які вибираються згідно з присутністю високого афінитету зв'язування як індикатора, далі досліджують на присутність спроможності індукувати CTL. У цьому описі винаходу фраза "спроможність індукувати CTL" вказує на спроможність пептиду індукувати CTL, коли вони представлені на антиген-презентуючих клітинах (APC). Крім того, "спроможність індукувати CTL" включає спроможність пептиду індукувати активацію CTL, проліферацію CTL, сприяти лізису клітин-мішеней за допомогою CTL та підвищувати виробництво CTL IFN-гамма.

Підтвердження спроможності індукувати CTL може бути виконано шляхом індукування APC, які несуть антигени MHC людини (наприклад, В-лімфоцити, макрофаги та дендритні клітини (DC)), або більш специфічно DC, що походять від моноклеарних лейкоцитів периферійної крові людини, та після стимуляції пептидами, змішування з CD8-позитивними Т-клітинами, та наступного вимірювання IFN-гамма, виробленого та вивільненого CTL проти клітин-мішеней. Як реакційну систему можна застосовувати трансгенних тварин, яких отримали для експресії антигену HLA людини (наприклад, тварин, описаних у BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA-A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Наприклад, клітини-мішені можна мітити радіоактивним ізотопом ⁵¹Cr та йому подібним, та цитотоксичну активність можна розрахувати з радіоактивності, вивільненої з клітин-мішеней. Альтернативно, її можна досліджувати шляхом вимірювання IFN-гамма, виробленого та вивільненого CTL у присутності APC, які несуть іммобілізовані пептиди, а також шляхом візуалізації зони інгібування на середовищах із застосуванням моноклональних антитіл проти IFN-гамма.

Шляхом дослідження спроможності пептидів індукувати CTL, як описано вище, можна визначити, що нонапептиди або декапептиди, що мають амінокислотну послідовність, вибрану серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, демонстрували особливо високу спроможність індукувати CTL, а також високий афінитет зв'язування з антигеном HLA. Отже, ці пептиди є прикладами переважних варіантів здійснення цього винаходу.

Крім того, аналізи гомології продемонстрували, що такі пептиди не мають суттєвої гомології з пептидами, що походять від інших відомих генних продуктів людини. Відповідно, ймовірність невідомих та небажаних імунних реакцій, виникаючих, коли їх застосовують для імунотерапії, може бути зменшена. Отже, також виходячи з цього аспекту, ці пептиди знаходять використання для викликання імунітету проти TOMM34 у пацієнтів з раком. Отже, переважними пептидами цього винаходу є ті пептиди, що складаються з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32.

Окрім модифікацій пептидів цього винаходу, які обговорюються вище, пептиди цього винаходу можуть також бути зшитими з іншими пептидами, доки вони зберігають спроможність індукувати CTL та, більш переважно, також зберігають своє необхідне зв'язування з HLA. Приклади придатних "інших" пептидів включають: пептиди цього винаходу або пептиди, які мають спроможність індукувати CTL та які походять від інших ТАА. Лінкери між пептидами є добре відомими у цій галузі, наприклад, AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmuller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) або K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

Наприклад, пептиди не- TOMM34 пухлиноасоційованих антигенів можна також застосовувати по суті одночасно, щоб підвищити імунну реакцію через HLA класу I та/або HLA класу II. Добре встановлено, що ракові клітини можуть експресувати більш ніж один пухлиноасоційований ген. Отже, до обсягу здійснення звичайного експерименту звичайним фахівцем у цій галузі входить визначення того, чи експресує певний суб'єкт додаткові пухлиноасоційовані гени, а потім включити пептиди, що зв'язуються з HLA класу I та/або HLA класу II, які походять від продуктів експресії таких генів, у композиції або вакцини з TOMM34.

Приклади пептидів, що зв'язуються з HLA класу I та HLA класу II, є відомими для звичайних фахівців у цій галузі (наприклад, див. Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995), та, отже, їх можна застосовувати у цьому винаході за подібними способами, як описано у цьому описі винаходу. Таким чином, звичайний фахівець у даній галузі може легко отримати поліпептиди, які включають один або більше пептидів TOMM34 та один або більше пептидів не-TOMM34, або нуклеїнові кислоти, що кодують такі поліпептиди, застосовуючи стандартні процедури молекулярної біології.

Описані вище пептиди називаються у цьому описі винаходу "політопами", тобто це групи з

двох або більше потенційно імуногенних пептидів або пептидів, що стимулюють імунну реакцію, які можна з'єднати разом у різних конфігураціях (наприклад, з'єднати ланцюгом, з'єднати з перекриванням). Політоп (або нуклеїнову кислоту, що кодує політоп) можна вводити за стандартним протоколом імунізації, наприклад, тваринам, для того, щоб випробувати ефективність політопу стосовно стимулювання, підсилення та/або викликання імунної реакції.

Пептиди можна з'єднувати разом безпосередньо або завдяки застосуванню фланкуючих послідовностей, щоб утворити політопи, та застосування політопів як вакцин є добре відомим у цій галузі (див., наприклад, Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(I):299-306, 1990). Політопи, що містять різну кількість та різні комбінації епітопів, можна отримати та випробувати стосовно розпізнавання їх CTL та стосовно ефективності у підвищенні імунної реакції.

Пептиди цього винаходу можна також зшивати з іншими речовинами, доки вони зберігають спроможність оригінального пептиду індукувати CTL. Приклади підхожих речовин можуть включати пептиди, ліпіди, цукор та цукрові ланцюги, ацетил-групи, природні та синтетичні полімери тощо. Пептиди можуть містити модифікації, такі як глікозилювання, окиснення бічних ланцюгів або фосфорилювання, доки модифікації не руйнують біологічну активність пептидів, як описано у цьому описі винаходу. Ці типи модифікацій можна здійснювати для надання додаткових функцій (наприклад, функції потрапляння у мішень та функції доставки) або для того, щоб стабілізувати поліпептид.

Наприклад, для того, щоб підвищити стабільність поліпептиду *in vivo*, у цій галузі відомо введення D-амінокислот, амінокислотних міметиків або неприродних амінокислот; цю концепцію можна також прийняти для поліпептидів цього винаходу. Стабільність поліпептиду можна проаналізувати рядом способів. Наприклад, для того, щоб випробувати стабільність, можна застосовувати пептидази та різні біологічні середовища, такі як плазма або сироватка людини (дивись, наприклад, Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

Крім того, як вказано вище, серед модифікованих пептидів, у яких заміщені, видалені, вставлені або додані один, два або декілька амінокислотних залишків, ті пептиди, які мають таку саму або більш високу активність порівняно з оригінальними пептидами, можна піддати скринінгу або вибрати. Отже, цим винаходом також пропонується спосіб скринінгу або вибору модифікованих пептидів, які мають таку саму або більш високу активність порівняно з оригінальними. Наприклад, спосіб може включати етапи:

a: заміщення, видалення, вставлення або додавання принаймні одного амінокислотного залишку до пептиду цього винаходу,

b: визначення активності згаданого пептиду, та

c: вибір пептиду, який має таку саму або більш високу активність порівняно з оригінальним.

У цьому описі винаходу згадана активність може включати активність зв'язуватися з МНС, спроможність індукувати APC або CTL та цитотоксичну активність.

Коли пептиди цього винаходу включають цистеїновий залишок, тоді ці пептиди мають тенденцію утворювати димери через дисульфідний зв'язок між групами SH цистеїнових залишків. Отже, димери пептиду цього винаходу також включені до пептидів цього винаходу.

III. Отримання пептидів TOMM34

Пептиди цього винаходу можна отримати, застосовуючи добре відомі способи. Наприклад, пептиди можна отримати шляхом синтезу, за технологією рекомбінантної ДНК або шляхом хімічного синтезу. Пептиди цього винаходу можна синтезувати окремо або як довші поліпептиди, які включають два або більше пептидів. Пептиди можна виділити, тобто очистити або по суті відокремити від інших природно виникаючих білків клітин-хазяїнів або їх фрагментів, або від інших хімічних речовин.

Пептиди цього винаходу можуть містити модифікації, такі як глікозилювання, окиснення бічного ланцюга або фосфорилювання, за умови, що такі модифікації не руйнують біологічну активність оригінального пептиду. Інші приклади модифікацій включають включення D-амінокислот або інших амінокислотних міметиків, які можна застосовувати, наприклад, для подовження періоду напівжиття пептидів у сироватці.

Пептиди цього винаходу можна отримати за допомогою хімічного синтезу на основі вибраної амінокислотної послідовності. Наприклад, традиційні способи хімічного синтезу пептидів, які можна застосовувати для цього синтезу, включають:

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

(iii) Peptide Synthesis (на японській мові), Maruzen Co., 1975;

(iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (на японській мові), Maruzen Co., 1985;

(v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (на японській мові), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

(vi) WO99/67288; i

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

Альтернативно, пептиди цього винаходу можна отримати, адаптувавши будь-які відомі способи генної інженерії для отримання пептидів (наприклад, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62). Наприклад, по-перше, придатний вектор, який містить полінуклеотид, що кодує цільовий пептид у придатній для експресії формі (наприклад, праворуч від регуляторної послідовності, яка відповідає послідовності промотора), отримують та трансформують у придатній клітині-хазяїні. Такі вектори та клітини-хазяїни також пропонуються цим винаходом. Клітини-хазяїни потім культивують з метою отримання пептиду, який представляє інтерес. Пептид можна також отримати *in vitro*, застосовуючи систему трансляції *in vitro*.

15 IV. Полінуклеотиди

Цим винаходом пропонується полінуклеотиди, які кодують будь-які з вищезгаданих пептидів цього винаходу. Вони включають полінуклеотиди, які походять від природно виникаючого гена ТОММ34 (наприклад, SEQ ID NO: 42 (GenBank Accession No. NM_006809)), та полінуклеотиди, які мають їх консервативно модифіковані нуклеотидні послідовності. У цьому описі винаходу фраза "консервативно модифікована нуклеотидна послідовність" відноситься до послідовностей, які кодують ідентичні або по суті ідентичні амінокислотні послідовності. Внаслідок дегенерації генетичного коду велика кількість функціонально ідентичних нуклеїнових кислот кодує будь-який даний білок. Наприклад, усі кодони GCA, GCC, GCG та GCU кодують амінокислотний залишок аланін. Отже, на кожній позиції, де аланін визначається кодоном, цей кодон можна перетворити на будь-який з відповідних описаних кодонів без зміни кодованого поліпептиду. Такі варіації нуклеїнових кислот є "мовчазними варіаціями", які є одним з видів консервативно модифікованих варіацій. Кожна нуклеїновоокислотна послідовність у цьому описі винаходу, яка кодує пептид, також описує кожну можливу тиху варіацію нуклеїнової кислоти. Звичайний фахівець у цій галузі зрозуміє, що кожен кодон у нуклеїновій кислоті (за винятком AUG, який зазвичай є єдиним кодоном для метіоніну, та TGG, який зазвичай є єдиним кодоном для триптофану) можна модифікувати з метою отримання функціонально ідентичної молекули. Відповідно, кожна мовчазна варіація нуклеїнової кислоти, що кодує пептид, імпліцитно описана в кожній розкритій послідовності.

Полінуклеотид цього винаходу може складатися з ДНК, РНК та їх похідних. Як добре відомо у цій галузі, молекула ДНК складається з основ, таких як природно виникаючі основи А, Т, С та G, при цьому Т заміщується U в РНК. Фахівець у цій галузі зрозуміє, що неприродно виникаючі основи можуть бути також включеними до полінуклеотидів.

Полінуклеотиди цього винаходу можуть кодувати численні пептиди цього винаходу з проміжними амінокислотними послідовностями або без них. Наприклад, проміжна амінокислотна послідовність може забезпечити сайт розщеплення (наприклад, послідовність розпізнавання ферментом) полінуклеотиду або трансльованих пептидів. Крім того, полінуклеотид може включати будь-які додаткові послідовності до кодувальної послідовності, яка кодує пептид цього винаходу. Наприклад, полінуклеотид може бути рекомбінантним полінуклеотидом, який включає регуляторні послідовності, необхідні для експресії пептиду, або може бути вектором експресії (плазмідною) з маркерними генами або їм подібним. Взагалі, такі рекомбінантні полінуклеотиди можна отримати завдяки маніпуляції з полінуклеотидами за допомогою традиційних рекомбінантних способів, застосовуючи, наприклад, полімерази та ендонуклеази.

Як рекомбінантні способи, так і способи хімічного синтезу можна застосовувати для отримання полінуклеотидів цього винаходу. Наприклад, полінуклеотид можна отримати шляхом вставки у відповідний вектор, який може експресуватися, коли трансфектується у компетентну клітину. Альтернативно, полінуклеотид можна ампліфікувати, застосовуючи способи ПЛР або експресію у придатних хазяїнах (див., наприклад, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). Альтернативно, полінуклеотид можна синтезувати, застосовуючи твердофазні способи, як описано у Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5.

V. Екзосоми

Цим винаходом далі пропонуються внутрішньоклітинні візикули, що називаються екзосомами, які презентують комплекси, утворені між пептидами цього винаходу та антигенами HLA, на їх поверхнях. Екзосоми можна отримати, наприклад, застосовуючи способи, докладно

описані у опублікованій японській патентній заявці Kohyo Publications No. Hei 11-510507 та WO99/03499, та їх можна отримати, застосовуючи APC, узяті від пацієнтів, яких піддають лікуванню та/або профілактиці. Екзосоми цього винаходу можна інокулювати як вакцини, подібно до пептидів цього винаходу.

Тип антигенів HLA, включених в комплекси, має відповідати типу суб'єкта, якому необхідне лікування та/або профілактика. Наприклад, для представника японської національності достатньо домінуючими є HLA-A2, особливо HLA-A*0201 та HLA-A*0206, та, отже, вони будуть відповідними для лікування пацієнтів японської національності. Застосування типу HLA-A2, що надзвичайно експресується серед представників японської національності та представників білої європейської раси, є переважним для отримання ефективних результатів, та знаходять застосування підтипи, такі як HLA-A*0201 та HLA-A*0206. Зазвичай, у клінічній практиці тип антигену HLA пацієнта, якому потрібне лікування, досліджується заздалегідь, що дозволяє зробити відповідний вибір пептидів, які мають високі рівні афінитету зв'язування з цим антигеном, або які мають спроможність індукувати CTL внаслідок антиген-презентації. Крім того, для того, щоб отримати пептиди, які демонструють високий афінитет зв'язування та спроможність індукувати CTL, можна здійснювати заміщення, видалення, вставлення або додавання однієї, двох або декількох амінокислот на основі амінокислотної послідовності природно виникаючого часткового пептиду TOMM34.

Коли екзосоми цього винаходу мають антиген HLA типу HLA-A2, тоді особливого застосування знаходять пептиди, які включають амінокислотну послідовність, вибрану серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32.

VI. Антиген-презентуючі клітини (APC)

Цим винаходом також пропонуються виділені антиген-презентуючі клітини (APC), які презентують комплекси, утворені між антигенами HLA та пептидами цього винаходу, на їх поверхні. APC можуть походити від пацієнтів, які піддаються лікуванню та/або профілактиці, та їх можна вводити як вакцини самостійно або у комбінації з іншими ліками, включаючи пептиди цього винаходу, екзосоми або CTL.

APC не обмежуються певним типом клітин. Приклади APC включають, проте не обмежуються тільки ними, дендритні клітини (DC), клітини Лангерганса, макрофаги, В-клітини та активовані Т-клітини, про які відомо, що вони презентують білковоподібні антигени на своїй клітинній поверхні, так що вони розпізнаються лімфоцитами. Оскільки дендритні клітини є прикладом APC з найсильнішою серед APC дією індукувати CTL, то DC знаходять застосування як APC цього винаходу.

Наприклад, APC цього винаходу можна отримати шляхом індукування DC з моноцитів периферійної крові з наступним піддаванням контактуванню (стимулюванню) їх з пептидами цього винаходу *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*. Коли пептиди цього винаходу вводяться суб'єктам, тоді APC, які презентують пептиди цього винаходу, індукуються у тілі суб'єкта. Фраза "індукування APC" включає контактування (стимулювання) клітини з пептидами цього винаходу або введення полінуклетида, що кодує пептиди цього винаходу, в клітину, щоб представити комплекс, утворений між антигеном HLA та пептидами цього винаходу, на клітинній поверхні. Отже, APC цього винаходу можна отримати шляхом узяття APC від суб'єкта після введення пептидів цього винаходу суб'єктові. Альтернативно, APC цього винаходу можна отримати шляхом контактування APC, узятих від суб'єкта, з пептидом цього винаходу.

APC цього винаходу можна вводити суб'єктові для індукування імунної реакції проти раку у цього суб'єкта самі по собі або у комбінації з іншими ліками, включаючи пептиди, екзосоми або CTL цього винаходу. Наприклад, введення *ex vivo* може включати етапи:

- a: узяття APC у першого суб'єкта,
- b: контактування APC з етапу (a) з пептидом, та
- c: введення APC з етапу (b) другому суб'єктові.

Перший суб'єкт та другий суб'єкт можуть бути одним й тим же суб'єктом або можуть бути різними суб'єктами. APC, отримані на етапі (b), можуть слугувати як вакцина для лікування та/або профілактики раку, приклади якого включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини.

В контексті цього винаходу можна використовувати пептиди цього винаходу для виробництва фармацевтичної композиції або агента, здатного індукувати антиген-презентуючі клітини. Тут пропонується спосіб або процес виробництва фармацевтичної композиції або агента для індукування антиген-презентуючих клітин, та переважно він включає етап змішування пептиду винаходу з фармацевтично прийнятним носієм або введення його до

складу.

Цим винаходом також пропонується застосування пептидів цього винаходу для індукування антиген-презентуючих клітин.

Згідно з аспектом цього винаходу APC цього винаходу мають високий рівень спроможності індукувати CTL. У фразі "високий рівень спроможності індукувати CTL" високий рівень означає, що спроможність індукувати CTL є відносно високою у порівнянні з рівнем спроможності індукувати CTL, який виявили у APC, що не контактували з пептидами. Такі APC, які мають високий рівень спроможності індукувати CTL, можна отримати за допомогою способу, який включає етап перенесення полінуклеотиду, який кодує пептид цього винаходу, до APC *in vitro*, а також за допомогою способу, згаданого вище. Введені полінуклеотиди можуть бути у формі ДНК або РНК. Приклади способів введення включають, без особливих обмежень, різні способи, які традиційно здійснюються у цій галузі, такі як ліпофекція, електропорація та спосіб осадження з фосфатом кальцію. Детальніше, введення можна здійснювати так, як описано у Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; в опублікованому японському перекладі міжнародної публікації № 2000-509281. Внаслідок перенесення гена, що кодує пептид цього винаходу, до APC ген піддається транскрипції, трансляції та тому подібному у клітині, а потім отримані білки обробляються МНС класу I або класу II, та вони проходять крізь каскад реакцій презентації, щоб презентувати пептиди цього винаходу.

Альтернативно, APC цього винаходу можна одержати за способом, який включає етап контактування APC з пептидом цього винаходу. У деяких варіантах здійснення APC цього винаходу презентують комплекси антигену HLA-A2 та пептиду цього винаходу на своїй поверхні.

VII. Цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL)

CTL, що індукується проти будь-якого з пептидів цього винаходу, підсилює *in vivo* імунну реакцію, яка націлена на ракові клітини, та внаслідок цього його можна застосовувати як вакцину, подібно до пептидів самих по собі. Отже, цим винаходом пропонується виділені CTL, які специфічно індукуються або активуються будь-яким з пептидів цього винаходу.

Такі CTL можна отримати шляхом (1) введення пептиду (пептидів) цього винаходу суб'єктові, шляхом (2) контактування (стимулювання) похідних від суб'єкта APC та CD8-позитивних Т-клітин або моноклеарних лейкоцитів периферійної крові *in vitro* з пептидом (пептидами) цього винаходу, шляхом (3) контактування CD8-позитивних Т-клітин або моноклеарних лейкоцитів периферійної крові *in vitro* з APC або екзосомами, які презентують комплекс антигену HLA та пептиду цього винаходу на їх поверхні, або шляхом (4) введення полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують субодиниці рецептора Т-клітин (TCR), де TCR, утворений такими субодиницями TCR, спроможний зв'язуватися з комплексом антигену HLA та пептиду цього винаходу на клітинній поверхні. Такі APC або екзосоми для метода (3) можна отримати за допомогою способів, описаних вище. Деталі способу (4) докладно описано нижче у розділі "VIII. Рецептор Т-клітин (TCR)".

CTL цього винаходу можуть походити від пацієнтів, яких піддають лікуванню та/або профілактиці, та їх можна вводити самих по собі або у комбінації з іншими ліками, які включають пептиди цього винаходу або екзосоми, з метою отримання регуляційних ефектів. Отримані CTL діють специфічно проти клітин-мішеней, які презентують пептиди цього винаходу, наприклад, такі самі пептиди, що застосовуються для індукції. Клітини-мішені можуть бути клітинами, які ендогенно експресують TOMM34, такими як ракові клітини, або клітинами, які трансфектуються геном TOMM34; а клітини, які презентують пептиди цього винаходу на клітинній поверхні внаслідок стимуляції пептидом, можуть також слугувати мішенями атаки активованих CTL.

В деяких варіантах здійснення CTL цього винаходу являють собою CTL, що розпізнають клітини, які презентують комплекси антигену HLA-A2 та пептиду цього винаходу на їх поверхні. У контексті цього CTL, фраза "розпізнають клітину" відноситься до зв'язування комплексу антигену HLA-A2 та пептиду цього винаходу на клітинній поверхні через їх TCR та до демонстрування специфічної цитотоксичної активності проти цієї клітини. У цьому описі фраза "специфічна цитотоксична активність" відноситься до демонстрування цитотоксичної активності проти клітини, що презентує комплекс антигену HLA-A2 та пептиду цього винаходу, але не проти інших клітин.

VIII. Рецептор Т-клітин (TCR)

Цим винаходом також пропонується композиція, яка містить полінуклеотид/полінуклеотиди, які кодують поліпептиди, які є спроможними утворювати субодиницю рецептора Т-клітин (TCR), та способи її застосування. Такі субодиниці TCR мають спроможність утворювати TCR, які надають специфічності Т-клітинам проти пухлинних клітин, які експресують TOMM34. Застосовуючи відомі у цій галузі способи, можна ідентифікувати полінуклеотид/полінуклеотиди,

що кодують кожний з альфа- та бета-ланцюгів субодиниць TCR лімфоциту CTL, індукованого пептидами цього винаходу (WO2007/032255 і Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Наприклад, спосіб ПЛР є переважним для аналізу TCR. Праймерами ПЛР для аналізу можуть бути, наприклад, 5'-R праймери (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (SEQ ID NO: 43) як 5' бічні праймери, а 3'-TRA-C праймери (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO: 44), специфічні до С ділянки альфа ланцюга TCR, 3'-TRb-C1 праймери (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO: 45), специфічні до С1 ділянки бета-ланцюга TCR, або 3'-TRbeta-C2 праймери (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ ID NO: 46), специфічні до С2 ділянки бета-ланцюга TCR, як 3' бічні праймери, проте вони не обмежуються ними. Похідні TCR можуть зв'язуватися з клітинами-мішенями, які презентують пептид TOMM34 цього винаходу, з високою авідністю, та вони доволіно опосередковують ефективне вбивство клітин-мішеней, які презентують пептид TOMM34 цього винаходу *in vivo* та *in vitro*.

Полінуклеотид/полінуклеотиди, що кодують субодиниці TCR (тобто полінуклеотид, що кодує обидві субодиниці TCR, або полінуклеотиди, що кодують кожну з субодиниць TCR), можуть бути включеними у придатні вектори, наприклад, ретровірусні вектори. Ці вектори є добре відомими у галузі. Полінуклеотид або вектори, що його включають, можна з користю перенести у Т-клітину (наприклад, у CD8-позитивну Т-клітину), наприклад, Т-клітину від пацієнта. Переважно, цим винаходом пропонується готова до негайного використання композиція, яка дозволяє швидко модифікувати власні Т-клітини пацієнта (або клітини іншого ссавця), щоб швидко і легко отримати модифіковані Т-клітини, які мають відмінні властивості вбивати ракові клітини.

Специфічний TCR проти пептиду цього винаходу - це рецептор, який є спроможним специфічно розпізнавати комплекс пептиду цього винаходу та антигену HLA, надаючи Т-клітині специфічної активності проти клітини-мішені, яка презентує комплекс пептиду цього винаходу та антигену HLA, коли TCR експресується на поверхні Т-клітини. Відомими методами можна підтвердити, що CTL, одержані шляхом введення поліпептиду(ів), що кодує(ють) такі субодиниці TCR, можуть специфічно розпізнавати такі клітини-мішені. Переважні приклади таких методів включають, наприклад, тетрамерний аналіз із застосуванням молекули HLA та пептиду цього винаходу та імуноферментний спот-аналіз (ELISPOT). Виконуючи імуноферментний спот-аналіз, можна підтвердити, що CTL, одержаний за методом, описаним вище, може специфічно розпізнавати клітини-мішені, та що сигнали, які генеруються таким розпізнаванням, можуть бути передані внутрішньоклітинно. Крім того, відомими методами можна підтвердити, що CTL, одержані за описаним вище методом, мають специфічну цитотоксичну активність проти клітин-мішеней. Приклади таких методів включають, наприклад, аналіз вивільнення хрому із використанням клітин, які експресують як антиген HLA-A2, так і TOMM34.

В одному аспекті цим винаходом пропонується CTL, які отримують шляхом трансдукції полінуклеотидом/полінуклеотидами, які кодують поліпептиди субодиниць TCR (наприклад, полінуклеотид, що кодує обидві субодиниці TCR, або полінуклеотиди, що кодують кожну з субодиниць TCR), де TCR, утворений такими субодиницями TCR, може зв'язуватися з комплексом пептиду TOMM34, який має амінокислотну послідовність, вибрану серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, та антигену HLA-A2 на клітинній поверхні.

Трансдуковані CTL є спроможними надавати хомінг раковим клітинам *in vivo*, та їх можна розмножувати згідно з добре відомими способами культивування *in vitro* (наприклад, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). CTL цього винаходу можна застосовувати для утворення імуногенної композиції, корисної як при лікуванні, так і при профілактиці раку у пацієнта, якому потрібне лікування або захист (WO2006/031221).

IX. Фармацевтичні агенти або композиції

Оскільки експресія TOMM34 специфічно підвищується при раку, приклади якого включають, проте не обмежуються тільки ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини, порівняно зі здоровою тканиною, то пептиди цього винаходу або полінуклеотиди цього винаходу можна застосовувати для лікування, та/або профілактики раку, та/або попередження післяопераційного рецидиву раку. Отже, цим винаходом пропонується фармацевтичний агент або композиція, складена для лікування та/або профілактики раку та/або попередження післяопераційного рецидиву вищевказаного раку, при цьому така композиція містить як активний інгредієнт один або більше пептидів або полінуклеотидів цього винаходу. Альтернативно, пептиди цього винаходу можуть експресуватися на поверхні будь-яких вищезгаданих екзосом або клітин, таких як APC, для застосування як фармацевтичних агентів або композицій. Крім того, вищезгадані CTL, які націлені на будь-які пептиди цього винаходу, можна також застосовувати як активний інгредієнт фармацевтичних агентів або композицій цього винаходу.

Фармацевтичні композиції цього винаходу також знаходять застосування як вакцина. У контексті цього винаходу термін "вакцина" (також називається імуногенною композицією) означає композицію, яка має функцію покращувати, підсилювати та/або індукувати протипухлинний імунітет після інокуляції у тварин.

Фармацевтичні композиції цього винаходу можна застосовувати для лікування та/або профілактики раку та/або попередження післяопераційного рецидиву раку у суб'єктів або пацієнтів, включаючи людину та будь-якого іншого ссавця, включаючи, проте не обмежуючись тільки ними, мишу, щура, морську свинку, кроля, кішку, собаку, вівцю, козла, свиню, велику рогату худобу, коня, мавпу, павіана та шимпанзе, особливо комерційно важливу тварину або домашню тварину.

В іншому варіанті здійснення цим винаходом також пропонується застосування активного інгредієнта у виробництві фармацевтичної композиції або агента для лікування раку або пухлини, при цьому згаданий активний інгредієнт вибраний серед:

(a) пептиду цього винаходу;

(b) нуклеїнової кислоти, що кодує такий пептид, як описано у цьому описі винаходу, у придатній для експресії формі;

(c) APC або екзосоми, що презентує на своїй поверхні пептид цього винаходу; та

(d) цитотоксичної Т-клітини цього винаходу.

Альтернативно, цим винаходом далі пропонується активний інгредієнт для застосування при лікуванні та/або профілактиці різних видів раку або пухлин, при цьому згаданий активний інгредієнт вибраний серед:

(a) пептиду цього винаходу;

(b) нуклеїнової кислоти, що кодує такий пептид, як описано у цьому описі винаходу, у придатній для експресії формі;

(c) APC або екзосоми, що презентує на своїй поверхні пептид цього винаходу; та

(d) цитотоксичної Т-клітини цього винаходу.

Альтернативно, цим винаходом далі пропонується спосіб або процес виробництва фармацевтичної композиції або агента для лікування або профілактики раку або пухлини, де спосіб або процес включає етап змішування фармацевтично або фізіологічно прийняттого носія з активним інгредієнтом, вибраного серед:

(a) пептиду цього винаходу;

(b) нуклеїнової кислоти, що кодує такий пептид, як описано у цьому описі винаходу, у придатній для експресії формі;

(c) APC або екзосоми, що презентує на своїй поверхні пептид цього винаходу; та

(d) цитотоксичної Т-клітини цього винаходу.

В іншому варіанті здійснення цим винаходом також пропонується спосіб або процес виробництва фармацевтичної композиції або агента для лікування або профілактики раку або пухлини, де спосіб або процес включає етапи змішування фармацевтично або фізіологічно прийняттого носія з активним інгредієнтом, де активний інгредієнт вибирають серед:

(a) пептиду цього винаходу;

(b) нуклеїнової кислоти, що кодує такий пептид, як описано у цьому описі винаходу, у придатній для експресії формі;

(c) APC або екзосоми, що презентує на своїй поверхні пептид цього винаходу; та

(d) цитотоксичної Т-клітини цього винаходу.

Фармацевтичні агенти або композиції цього винаходу можна застосовувати для лікування та/або профілактики раку та/або попередження післяопераційного рецидиву раку у суб'єктів або пацієнтів, включаючи людину та будь-якого іншого ссавця, включаючи, проте не обмежуючись тільки ними, мишу, щура, морську свинку, кроля, кішку, собаку, вівцю, козла, свиню, велику рогату худобу, коня, мавпу, павіана та шимпанзе, особливо комерційно важливу тварину або домашню тварину.

Згідно з цим винаходом визначили, що пептиди, які включають амінокислотну послідовність, вибрану серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, є HLA-A2-обмеженими епітопними пептидами або кандидатами, які можуть індукувати сильну та специфічну імунну реакцію. Отже, представлені фармацевтичні агенти або композиції, які містять будь-які з цих пептидів з амінокислотними послідовностями за SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, є особливо придатними для введення суб'єктам, антиген HLA яких являє собою HLA-A2. Таке саме стосується фармацевтичних агентів або композицій, які містять поліпептиди, які кодують будь-які з цих пептидів (тобто поліпептиди цього винаходу).

Види раку, які слід лікувати фармацевтичними агентами або композиціями цього винаходу, не обмежуються та включають будь-який вид раку, у якому бере участь TOMM34 (наприклад,

надмірно експресується), включаючи, проте не обмежуючись ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини.

Фармацевтичні агенти або композиції цього винаходу можуть містити окрім вищезгаданих активних інгредієнтів інші пептиди, що мають спроможність індукувати CTL проти ракових клітин, інші полінуклеотиди, які кодують ці інші пептиди, інші клітини, які презентують ці інші пептиди, та їм подібне. Приклади таких "інших" пептидів, які мають спроможність індукувати CTL проти ракових клітин, включають, але не обмежуються тільки ними, специфічні для раку антигени (наприклад, ідентифіковані TAA).

За необхідністю фармацевтичні агенти або композиції цього винаходу можуть необов'язково містити інші терапевтичні речовини як активний інгредієнт, доки речовина не інгібує протипухлинний ефект активного інгредієнта, наприклад, будь-якого з пептидів цього винаходу. Наприклад, лікарські форми можуть включати протизапальні речовини або композиції, знеболювальні речовини, хіміотерапевтичні речовини та їм подібне. Окрім введення інших терапевтичних речовин у сам медикамент, медикаменти цього винаходу можна також вводити послідовно або одночасно з одним або декількома іншими фармакологічними композиціями. Кількість медикаменту та фармакологічної композиції залежить, наприклад, від типу фармакологічної композиції (композицій), що застосовується, хвороби, яку лікують, та протоколу та способів введення.

Фахівець у цій галузі легко зрозуміє, що, окрім інгредієнтів, які особливо згадуються у цьому описі винаходу, фармацевтичні агенти або композиції цього винаходу можуть також містити інші речовини, які є традиційними у цій галузі, враховуючи тип лікарської форми, що розглядається (наприклад, наповнювачі, зв'язувальні агенти, розріджувачі тощо).

В одному варіанті цього винаходу фармацевтичні агенти або композиції цього винаходу можна упакувати у одиниці виробництва, наприклад набори, що містять матеріали, які є корисними для лікування патологічних станів хвороби, яку слід лікувати, наприклад, раку. Одиниця виробництва може включати контейнер з міткою з будь-якими фармацевтичними агентами або композиціями цього винаходу. Придатні контейнери включають пляшки, ампули та пробірки. Контейнери можна виготовити з різноманітних матеріалів, таких як скло або пластик. Мітка на контейнері має вказувати агент або композицію, яка застосовується для лікування або попередження одного або більше станів хвороби. Мітка може також вказувати на способи введення тощо.

Окрім контейнера, описаного вище, набір, який включає фармацевтичний агент або композицію цього винаходу, може необов'язково далі включати другий контейнер, який містить фармацевтично прийнятний розріджувач. Він може далі включати інші матеріали, що є бажаними з комерційної точки зору та з точки зору користувача, при цьому вони включають буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци та листівку-вкладиш з інструкціями для застосування.

Фармацевтичні композиції можуть, якщо бажано, знаходитися в упаковці або у пристрої з дозатором, що може містити одну або більше лікарських форм, які містять активний інгредієнт. Упаковка може, наприклад, включати металеву або пластикову плівку, таку як блістерна упаковка. Упаковка або пристрій з дозатором можуть супроводжуватися інструкціями для введення.

(1) Фармацевтичні агенти або композиції, що містять пептиди як активний інгредієнт

Пептиди цього винаходу можна вводити безпосередньо як фармацевтичний агент або композицію або, якщо необхідно, їх можна виготовляти за допомогою традиційних способів виготовлення лікарських форм. В останньому випадку, окрім пептидів цього винаходу, носії, наповнювачі та їм подібне, що зазвичай застосовується для ліків, можна включати як те, що є відповідним, без особливих обмежень. Приклади таких носіїв - це стерилізована вода, фізіологічний сольовий розчин, фосфатний буфер, культуральна рідина та їм подібне. Крім того, фармацевтичні агенти або композиції можуть містити, якщо необхідно, стабілізатори, суспензії, консерванти, сурфактанти та їм подібне. Фармацевтичні агенти або композиції цього винаходу можна застосовувати для протиракових цілей.

Пептиди цього винаходу можна отримати у комбінації, яка включає два або більше пептидів цього винаходу, щоб індукувати CTL *in vivo*. Пептиди можуть бути у вигляді коктейлю, або їх можна зв'язати один з одним, застосовуючи стандартні способи. Наприклад, пептиди можна зшити хімічними способами, або їх можна експресувати як послідовність єдиного злитого поліпептиду, яка може мати одну або декілька амінокислот як лінкер (наприклад, Lysine linker: K. S. Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Пептиди у комбінації можуть бути однаковими або різними. Внаслідок введення пептидів цього винаходу пептиди презентуються

на APC з високою щільністю антигенами HLA, потім індукують CTL, які специфічно реагують у напрямку комплексу, утвореного між виявленим пептидом та антигеном HLA. Альтернативно, APC (наприклад, DC) беруться у суб'єктів, а потім їх стимулюють пептидами цього винаходу для отримання APC, які презентують будь-який з пептидів цього винаходу на їх клітинній поверхні.

5 Ці APC знов вводяться суб'єктам з метою індукування CTL у суб'єктів, внаслідок чого можна збільшити агресивність стосовно пухлиноасоційованого ендотелію.

Фармацевтичні агенти або композиції для лікування та/або профілактики раку, які містять будь-який пептид цього винаходу як активний інгредієнт, можуть додатково містити ад'ювант, так щоб отримати ефективний клітинний імунітет, або їх можна вводити з іншими активними інгредієнтами та вони можуть бути введені у такий лікарській формі як гранули. Ад'ювант означає будь-яку сполуку, яка підсилює імунну реакцію проти білка, коли його вводять разом (або послідовно) з білком, який має імунологічну активність. Ад'ювант, який можна застосовувати, включає ті ад'юванти, які описані у літературі (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Приклади ад'ювантів включають фосфат алюмінію, гідроксид алюмінію, галун, токсин холери, токсин сальмонели, неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), повний ад'ювант Фрейнда (CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, емульсію O/W та їм подібне, проте вони не обмежуються ними.

Крім того, можна традиційно застосовувати ліпосомні лікарські форми, гранулярні лікарські форми, у яких пептид зв'язаний з гранулами діаметром декілька мікрометрів, та лікарські форми, у яких ліпід зв'язаний з пептидом.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу пептиди цього винаходу можна також вводити у формі фармацевтично прийнятної солі. Переважні приклади солей включають солі з лужним металом, солі з металом, солі з органічною основою, солі з органічною кислотою та солі з неорганічною кислотою. Як використовується у цьому описі винаходу, фраза "фармацевтично прийнятна сіль" означає ті солі, які зберігають біологічну ефективність і властивості сполуки і які одержують реакцією з неорганічними кислотами або основами, такими як хлористоводнева кислота, бромистоводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота, метансульфонова кислота, етансульфонова кислота, п-толуолсульфонова кислота, саліцилова кислота та їм подібні.

У деяких варіантах здійснення фармацевтичні агенти або композиції цього винаходу можуть також містити компонент, який приміює CTL. Ліпіди ідентифікували як речовини або композиції, спроможні приміювати CTL in vivo проти вірусних антигенів. Наприклад, залишки пальмітинової кислоти можна приєднати до епсилон- та альфа-аміногруп залишку лізину, а потім зшити з пептидом цього винаходу. Цей ліпідований пептид можна потім вводити або безпосередньо у міцелі або частинці, включений в ліпосому, або емульсованим в ад'юванті. Як інший приклад приміювання реакцій CTL ліпідом, ліпопротеїни E. Coli, такі як трипальмітоїл-S-гліцерилцистеїніл-серил-серин (P3CSS), можна застосовувати для приміювання CTL, коли він ковалентно приєднаний до відповідного пептиду (див., наприклад, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

Приклади підхожих способів введення включають, але необов'язково обмежуються тільки ними, пероральний спосіб, інтрадермальну, підшкірну, внутрішньом'язову, внутрішньокісткову, перитонеальну та внутрішню ін'єкцію або їм подібне, та введення може бути системним або місцевим біля ділянок-мішеней. Введення можна здійснювати шляхом єдиного введення або шляхом вторинних множинних введень. Дозу пептидів цього винаходу можна привести у відповідність до хвороби, яку слід лікувати, віку пацієнта, маси, способу введення та їм подібного, та вона зазвичай становить від 0,001 мг до 1000 мг, наприклад, від 0,01 мг до 100 мг, наприклад, від 0,1 мг до 10 мг, наприклад, від 0,5 мг до 5 мг, та її можна вводити один раз на період від декілька днів до декілька місяців. Фахівець у цій галузі може відповідним чином вибрати придатну дозу.

(2) Фармацевтичні агенти або композиції, що містять полінуклеотиди як активний інгредієнт

Фармацевтичні агенти або композиції цього винаходу можуть також містити нуклеїнові кислоти, які кодують пептиди, описані у цьому описі винаходу, у здатній до експресії формі. У цьому описі винаходу фраза "у здатній для експресії формі" означає, що полінуклеотид, коли вводиться у клітину, буде експресуватися in vivo як поліпептид, який індукує протипухлинний імунітет. У прикладі варіанту здійснення послідовність нуклеїнової кислоти полінуклеотиду, що представляє інтерес, включає регуляторні елементи, які є необхідними для експресії полінуклеотиду. Полінуклеотид (полінуклеотиди) може бути обладнаним так, щоб здійснити стійку вставку в геном клітини-мішені (див., наприклад, Thomas KR & Capeschi MR, Cell 1987, 51: 503-12 стосовно опису гомологічних рекомбінантних касетних векторів. Дивись, наприклад, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; патенти США № 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647 та WO 98/04720). Приклади способів доставки на основі ДНК включають

"оголену ДНК", полегшену (опосередковану бупівакаїном, полімерами, пептидом) доставку, катіонні ліпідні комплекси та опосередковану частинками ("генна гармата") або опосередковану тиском доставку (дивись, наприклад, патент США № 5,922,687).

Пептиди цього винаходу можуть також експресуватися вірусними або бактеріальними векторами. Приклади векторів експресії включають ослаблених вірусних хазяїнів, таких як коров'яча віспа або віспа домашніх птахів. Такий підхід залучає застосування вірусу коров'ячої віспи, наприклад, як вектора для експресії нуклеотидних послідовностей, які кодують пептид. Після введення у хазяїна рекомбінантний вірус коров'ячої віспи експресує імуногенний пептид та тим самим викликає імунну реакцію. Вектори коров'ячої віспи та способи, корисні для здійснення протоколів імунізації, описано у, наприклад, патенті США № 4,722,848. Інший вектор - це BCG (бацила Кальмета-Герена). Вектори BCG описано у Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60. Очевидним буде широке різноманіття інших векторів, що є корисними для терапевтичного введення або імунізації, наприклад, вектори адено- та адено-асоційованих вірусів, ретровірусні вектори, вектори сальмонели тифі (*Salmonella typhi*), детоксифіковані вектори сибірської виразки та їм подібне. Див., наприклад, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85.

Доставка полінуклеотиду пацієнтові може бути або безпосередньою, у випадку якої пацієнт безпосередньо піддається впливу вектора, що несе полінуклеотид, або непрямую, у випадку якої клітини спочатку трансформуються *in vitro* полінуклеотидом, що представляє інтерес, а потім клітини трансплантуються пацієнтові. Ці два підходи називаються, відповідно, генною терапією *in vivo* та *ex vivo*.

Для загального огляду способів генної терапії див. Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215). Способи, які є загально відомими у галузі технології рекомбінантної ДНК та які можна застосовувати до цього винаходу, описані Ausubel зі співавторами в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; та Krieger в Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990.

Подібно до введення пептидів, введення полінуклеотидів може бути здійснене пероральним способом, інтрадермальною, підшкірною, внутрішньокістковою, перитонеальною та/або внутрішньою ін'єкцією або їм подібним, наприклад, системним введенням або місцевим введенням біля ділянок-мішеней. Введення можна здійснювати шляхом єдиного введення або шляхом вторинних множинних введень. Дозу полінуклеотиду у придатному носії або клітинах, трансформованих полінуклеотидом, що кодує пептиди цього винаходу, можна привести у відповідність до хвороби, яку слід лікувати, віку пацієнта, маси, способу введення та їм подібного, та вона зазвичай становить від 0,001 мг до 1000 мг, наприклад, від 0,01 мг до 100 мг, наприклад, від 0,1 мг до 10 мг, наприклад, від 0,5 мг до 5 мг, та її можна вводити один раз на період від декілька днів до декілька місяців. Фахівець у цій галузі може відповідним чином вибрати придатну дозу.

Х. Способи, що застосовують пептиди, екзосоми, APC та CTL

Пептиди та полінуклеотиди цього винаходу можна застосовувати для отримання або індукування APC та CTL. Екзосоми та APC цього винаходу можна також застосовувати для індукування CTL. Пептиди, полінуклеотиди, екзосоми та APC можна застосовувати у комбінації з будь-якими іншими сполуками, доки додаткові сполуки не інгібують їхню спроможність індукувати CTL. Отже, будь-які з вищезгаданих фармацевтичних агентів або композицій цього винаходу можна застосовувати для індукування CTL. Окрім цього, ті агенти або композиції, які містять пептиди та полінуклеотиди, можна також застосовувати для індукування APC, як пояснюється далі.

(1) Спосіб індукування антиген-презентуючих клітин (APC)

Цим винаходом пропонуються способи індукування APC з високою спроможністю індукувати CTL внаслідок застосування пептидів або полінуклеотидів цього винаходу. Способи цього винаходу включають етап контактування APC з пептидами цього винаходу *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*. Наприклад, спосіб контактування APC з пептидами *ex vivo* може включати етапи:

a: узяття APC у суб'єкта; та

b: контактування APC з етапу (a) з пептидом цього винаходу.

APC не обмежуються певним типом клітин. Приклади APC включають, але не обмежуються тільки ними, DC, клітини Лангерганса, макрофаги, В-клітини та активовані Т-клітини, про які відомо, що вони презентують білкові антигени на своїй клітинній поверхні, так що вони розпізнаються лімфоцитами. Переважно, можна застосовувати DC, оскільки вони мають найсильнішу серед APC спроможність індукувати CTL. Будь-який з пептидів цього винаходу

можна застосовувати самостійно або з іншими пептидами цього винаходу.

З іншого боку, коли пептиди цього винаходу вводяться суб'єктові, тоді APC вступають у контакт з пептидами *in vivo*, отже, APC з високою спроможністю індукувати CTL індукуються у тілі суб'єкта. Отже, спосіб цього винаходу може включати введення пептидів цього винаходу суб'єктові. Подібно до цього, коли полінуклеотиди цього винаходу вводяться суб'єктові у придатній для експресії формі, тоді пептиди цього винаходу експресуються та контактують з APC *in vivo*, отже, APC з високою спроможністю індукувати CTL індукуються у тілі суб'єкта. Отже, замість вищезгаданого етапу, спосіб цього винаходу може включати введення полінуклеотидів цього винаходу суб'єктові. "Придатна для експресії форма" описується вище у розділі "IX. Фармацевтичні агенти або композиції, (2) Фармацевтичні агенти або композиції, що містять полінуклеотиди як активний інгредієнт".

Альтернативно, спосіб цього винаходу може включати введення полінуклеотиду цього винаходу в APC з метою індукувати APC зі спроможністю індукування CTL. Наприклад, спосіб включає етапи:

а: узяття APC у пацієнта; та

б: введення полінуклеотиду, що кодує пептид цього винаходу.

Етап (б) можна здійснювати як описано вище у розділі "VI. Антиген-презентуючі клітини".

Альтернативно, цим винаходом пропонується спосіб отримання антиген-презентуючої клітини (APC), яка специфічно індукує активність CTL проти TOMM34, при цьому спосіб включає один з наступних етапів:

(а) контактування APC з пептидом цього винаходу *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*; та

(б) введення полінуклеотиду, що кодує пептид цього винаходу, в APC.

Альтернативно, цим винаходом пропонуються способи індукування APC, яка має спроможність індукувати CTL, причому способи включають етап, вибраний з групи, що складається з:

(а) контактування APC з пептидом цього винаходу, та

(б) введення полінуклеотиду, що кодує пептид цього винаходу, в APC.

Способи цього винаходу можна здійснювати *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*. Переважно, способи цього винаходу можна здійснювати *in vitro* або *ex vivo*. APC, використовувані для індукування APC, які мають спроможність індукувати CTL, можуть переважно бути APC, які експресують антиген HLA-A2. Такі APC можна отримати за способами, добре відомими у цій галузі, з моноклеарних клітин периферійної крові (PBMC), узятих у суб'єкта, антиген HLA якого – це HLA-A2. APC, індуковані за способом цього винаходу, можуть бути APC, які презентують на своїй поверхні комплекс пептиду цього винаходу та антигену HLA (антигену HLA A2). Коли APC, індуковані за способом цього винаходу, вводяться суб'єктові з метою індукувати імунні реакції проти раку у суб'єкта, тоді суб'єкт є переважно тим самим суб'єктом, від якого походять APC. Проте, суб'єкт може бути відмінним від донора APC, доки суб'єкт має однаковий тип HLA з донором APC.

В іншому варіанті здійснення цим винаходом пропонуються агенти або композиції для використання в індукванні APC, що мають спроможність індукувати CTL, і такі агенти або композиції містять один або більше пептидів або полінуклеотидів цього винаходу.

В іншому варіанті здійснення цим винаходом пропонується застосування пептиду цього винаходу або полінуклеотиду, що кодує пептид, у виробництві агента або композиції, складеної для індукування APC.

Альтернативно, цим винаходом далі пропонується пептид цього винаходу або поліпептид, що кодує пептид, для застосування в індукванні APC, що мають спроможність індукувати CTL.

(2) Спосіб індукування CTL

Цим винаходом також пропонуються способи індукування CTL із застосуванням пептидів, полінуклеотидів, або екзосом, або APC цього винаходу.

Цим винаходом також пропонуються способи індукування CTL із застосуванням полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують поліпептиди (тобто, субодиниці TCR), які є спроможними утворювати рецептор Т-клітини (TCR), який є здатним розпізнавати комплекс пептидів цього винаходу та антигенів HLA. Переважно, способи індукування CTL включають принаймні один етап, який вибирається серед:

а) контактування CD8-позитивної Т-клітини з антиген-презентуючою клітиною та/або екзосомою, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду цього винаходу; та

б) введення полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують поліпептиди, які є спроможними утворювати TCR, який є спроможним розпізнавати комплекс пептиду цього винаходу та антигену HLA, у CD8-позитивну Т-клітину.

Коли пептиди, поліпептиди, APC або екзосоми цього винаходу вводяться суб'єктові, тоді індукуються CTL у тілі суб'єкта та збільшується сила імунної реакції, що націлена на ракові клітини. Отже, замість вищевказаного етапу, способи цього винаходу можуть включати етап введення пептидів, полінуклеотидів, APC або екзосом цього винаходу суб'єктові.

5 Альтернативно, CTL можна також індукувати, застосовуючи їх *ex vivo*, та після індукування CTL активовані CTL можна повернути суб'єктові. Наприклад, спосіб може включати етапи:

a: узяття APC у суб'єкта;

b: контактування APC з етапу (a) з пептидом цього винаходу; та

c: спільне культивування APC з етапу (b) з CD8-позитивними Т-клітинами.

10 APC, які слід культивувати разом з CD8-позитивними Т-клітинами на вищевказаному етапі (c), можна також отримати шляхом перенесення гена, який включає полінуклеотид цього винаходу, в APC, як описано вище у розділі "VI. Антиген-презентуючі клітини", проте цей винахід не обмежується цим, та він охоплює будь-які APC, які ефективно презентують на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду цього винаходу.

15 Замість вищевказаних APC можна застосовувати екзосоми, які презентують на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду цього винаходу. А саме, цей винахід може включати етап спільного культивування екзосом, які презентують на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду цього винаходу. Такі екзосоми можна отримати за способами, описаними вище у розділі "V. Екзосоми".

20 Крім того, CTL цього винаходу можна індукувати шляхом введення у CD8-позитивну Т-клітину полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують субодиниці TCR, при цьому TCR, утворений такими субодиницями TCR, є спроможним зв'язуватися з комплексом антигену HLA та пептиду цього винаходу на клітинній поверхні. Таку трансдукцію можна виконати, як описано вище у розділі "VIII. Рецептор Т-клітин (TCR)".

25 Способи цього винаходу можна здійснювати *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*. Переважно, способи цього винаходу можна здійснювати *in vitro* або *ex vivo*. CD8-позитивні Т-клітини, що застосовуються для індукування CTL, можна отримати за добре відомими у цій галузі способами від PBMC, узятих у суб'єкта. У переважних варіантах здійснення донор для CD8-позитивних Т-клітин може бути суб'єктом, антиген HLA якого – це HLA-A2. CTL, індуковані за способами цього винаходу, можуть бути CTL, які розпізнають клітини, які презентують на своїй поверхні комплекс пептиду цього винаходу та антигену HLA. Коли CTL, індуковані за способом цього винаходу, вводяться суб'єктові з метою індукувати імунні реакції проти раку у суб'єкта, тоді суб'єкт є переважно тим самим суб'єктом, від якого походять CD8-позитивні Т-клітини. Проте, суб'єкт може бути відмінним від донора CD8-позитивних Т-клітин, доки суб'єкт має однаковий тип HLA з донором CD8-позитивних Т-клітин.

35 Крім того, цим винаходом пропонується спосіб або процес виготовлення фармацевтичної композиції, яка індукує CTL, де спосіб включає етап змішування пептиду цього винаходу з фармацевтично прийнятним носієм або введення його до складу.

40 В іншому варіанті здійснення цим винаходом пропонується агент або композиція для індукування CTL, при цьому цей агент або композиція містить один або більше пептидів, один або більше полінуклеотидів або одну або більше APC або екзосом цього винаходу.

В іншому варіанті здійснення цим винаходом пропонується застосування пептиду, полінуклеотиду або APC або екзосоми цього винаходу у виробництві агента або композиції, складеної для індукування CTL.

45 Альтернативно, цим винаходом далі пропонується пептид, полінуклеотид або APC або екзосома цього винаходу для застосування в індуванні CTL.

(3) Спосіб індукування імунної реакції

Крім того, цим винаходом пропонуються способи індукування імунної реакції проти захворювань, пов'язаних з ТОММ34. Придатні хвороби можуть включати рак, приклади якого включають, проте не обмежуються тільки ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини.

Способи цього винаходу включають етап введення агентів або композицій, які містять будь-які пептиди цього винаходу або полінуклеотиди, що їх кодують. Альтернативно, спосіб цього винаходу може включати етап введення екзосом або APC, які презентують будь-який з пептидів цього винаходу. Подробиці дивись у розділі "IX. Фармацевтичні агенти або композиції", особливо частину, яка описує застосування фармацевтичних агентів або композицій цього винаходу як вакцин. Крім того, екзосоми та APC, які можна застосовувати для способів індукування імунної реакції цього винаходу, докладно описано вище у розділах "V. Екзосоми", "VI. Антиген-презентуючі клітини (APC)" та (1) та (2) розділу "X. Способи, що застосовують

пептиди, екзосоми, APC та CTL".

Цим винаходом також пропонується спосіб або процес виготовлення фармацевтичного агента або композиції, що індукуює імунну реакцію, де спосіб включає етап змішування пептиду винаходу з фармацевтично прийнятним носієм або введення його до складу.

5 Альтернативно, спосіб цього винаходу може включати етап введення вакцини або фармацевтичної композиції цього винаходу, яка містить:

(a) пептид цього винаходу;

(b) нуклеїнову кислоту, яка кодує такий пептид, як описано у цьому описі винаходу, у придатній для експресії формі;

10 (c) APC або екзосому, яка презентує пептид цього винаходу на своїй поверхні; або

(d) цитотоксичну Т-клітину цього винаходу.

У контексті цього винаходу рак, який надмірно експресує TOMM34, можна лікувати цими активними інгредієнтами. Приклади таких видів раку включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини. Отже, до початку введення вакцин або фармацевтичних композицій, які містять ці активні інгредієнти, переважно переконатися, чи є підвищеним рівень експресії TOMM34 у клітинах або тканинах, які слід лікувати, порівняно зі здоровими клітинами того ж самого органа. Отже, в одному варіанті здійснення цим винаходом пропонується спосіб лікування раку, який експресує (надмірно експресує) TOMM34, при цьому спосіб може включати етапи:

20 i) визначення рівня експресії TOMM34 у клітинах або тканині (тканинах), узятих у пацієнта з раком, який слід лікувати;

ii) порівняння рівня експресії TOMM34 з нормальним контрольним рівнем; та

25 iii) введення принаймні одного компонента, який вибирають серед від (a) до (d), описаних вище, суб'єктові з раком, що надмірно експресує TOMM34, порівняно з нормальним контрольним рівнем.

Альтернативно, цим винаходом пропонується вакцина або фармацевтична композиція, яка містить принаймні один компонент, вибраний серед від (a) до (d), які описано вище, для застосування при введенні суб'єктові, який має рак, який надмірно експресує TOMM34. Іншими словами, цим винаходом далі пропонується спосіб ідентифікації суб'єкта, якого слід лікувати поліпептидом TOMM34 цього винаходу, при цьому такий спосіб включає етап визначення рівня експресії TOMM34 в узятих від суб'єкта клітинах або тканині (тканинах), де підвищення рівня порівняно з нормальним контрольним рівнем гена вказує на те, що суб'єкт має рак, який можна лікувати поліпептидом TOMM34 цього винаходу. Способи лікування раку цього винаходу більш докладно описуються далі.

30 Будь-яку узятую у суб'єкта клітину або тканину можна застосовувати для визначення експресії TOMM34, доки вона включає цільовий продукт транскрипції або трансляції TOMM34. Приклади придатних зразків включають, проте не обмежуються ними, тканини та рідини організму, такі як кров, слина та сеча. Переважно, щоб узятий у пацієнта зразок клітини або тканини містив клітинну популяцію, включаючи епітеліальну клітину, більш переважно ракову епітеліальну клітину або епітеліальну клітину, яка походить від тканини, яку підозрюють, що вона є раковою. Крім того, якщо необхідно, клітину можна очистити від отриманих тканин та рідин організму, а потім застосовувати як узятий у суб'єкта зразок.

45 Суб'єкт, якого слід лікувати за способом цього винаходу, є переважно ссавцем. Приклади ссавців включають, проте не обмежуються ними, людину, примата, який не є людиною, мишу, щура, собаку, кішку, коня та корову.

Згідно з цим винаходом визначається рівень експресії TOMM34 у клітинах або тканинах, узятих у суб'єкта. Рівень експресії можна визначити на рівні продукту транскрипції (нуклеїнової кислоти), застосовуючи відомі у цій галузі способи. Наприклад, мРНК TOMM34 можна кількісно проаналізувати, застосовуючи зонди за допомогою способів гібридизації (наприклад, нозерн-гібридизації). Детекцію можна здійснювати на чипі або матриці. Застосування матриці є переважним для детекції рівня експресії TOMM34. Фахівці у цій галузі можуть приготувати такі зонди, застосовуючи інформацію про послідовність TOMM34. Наприклад, кДНК TOMM34 можна застосовувати як зонди. Якщо необхідно, зонди можна помітити придатною міткою, такою як барвники, флуоресцентні речовини та ізотопи, та рівень експресії гена можна визначити як інтенсивність гібридизованих міток.

60 Крім того, продукт транскрипції TOMM34 можна кількісно проаналізувати, застосовуючи праймери, за допомогою способів детекції на основі ампліфікації (наприклад, ПЛР зі зворотною транскриптазою (RT-PCR)). Такі праймери можна отримати на основі доступної інформації про послідовність цього гена.

Специфічно, зонд або праймер, що застосовується для способу цього винаходу, гібридується з мРНК ТОММ34 у жорстких умовах, помірно жорстких умовах або умовах низької жорсткості. Як застосовується у цьому описі винаходу, фраза "жорсткі умови (гібридизації)" означає умови, при яких зонд або праймер будуть гібридуватися з їхньою цільовою послідовністю, але не з іншими послідовностями. Жорсткі умови залежать від послідовності, та вони будуть різними за різними обставинами. На відміну від коротших послідовностей специфічну гібридизацію довших послідовностей спостерігають при більш високих температурах. Взагалі, температура жорстких умов вибирається так, щоб вона була приблизно на 5 градусів за Цельсієм нижчою, ніж температура плавлення (T_m) для специфічної послідовності при визначеній іонній силі та рН. T_m - це температура (при визначеній іонній силі, рН та концентрації нуклеїнової кислоти), при якій 50 % зондів, комплементарних до їх цільової послідовності, гібридизуються з цільовою послідовністю у рівновазі. Оскільки цільові послідовності є зазвичай присутніми у надмірній кількості, то при T_m 50 % зондів захоплюються у рівновазі. Зазвичай, жорсткі умови будуть умовами, при яких концентрація солі становить менш ніж приблизно 1,0 М іону натрію, зазвичай приблизно від 0,01 до 1,0 М іону натрію (або інших солей) при рН від 7,0 до 8,3, та температура становить принаймні приблизно 30 градусів за Цельсієм для коротких зондів або праймерів (наприклад, від 10 до 50 нуклеотидів) та принаймні приблизно 60 градусів за Цельсієм для довших зондів або праймерів. Жорстких умов можна також досягти шляхом додавання дестабілізуючих речовин, таких як формамід.

Зонд або праймер цього винаходу є зазвичай суттєво очищеним олігонуклеотидом. Цей олігонуклеотид зазвичай включає ділянку нуклеотидної послідовності, яка гібридується у жорстких умовах з принаймні приблизно 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 або 25 послідовними нуклеотидними послідовностями смислового ланцюга нуклеїнової кислоти, включаючи послідовність ТОММ34, або нуклеотидними послідовностями антисмислового ланцюга нуклеїнової кислоти, що включає послідовність ТОММ34, або природно виникаючого мутанта цих послідовностей. Зокрема, наприклад, у переважному варіанті здійснення олігонуклеотид, який має довжину 5-50, можна застосовувати як праймер для ампліфікації генів, які слід виявити. Більш переважно, мРНК або кДНК гена ТОММ34 можна виявити за допомогою олігонуклеотидного зонда або праймера специфічного розміру, довжина якого взагалі становить 15-30 основ. Цей розмір може становити діапазон принаймні у 10 нуклеотидів, принаймні у 12 нуклеотидів, принаймні у 15 нуклеотидів, принаймні у 20 нуклеотидів, принаймні у 25 нуклеотидів, принаймні у 30 нуклеотидів, і ці зонди або праймери можуть за розмірами становити діапазон у 5-10 нуклеотидів, 10-15 нуклеотидів, 15-20 нуклеотидів, 20-25 нуклеотидів та 25-30 нуклеотидів. У переважному варіанті здійснення довжину олігонуклеотидного зонда або праймера можна вибрати від 15 до 25. Процедури аналізів, пристрої або реагенти для детекції гена шляхом застосування такого олігонуклеотидного зонда або праймера є добре відомими (наприклад, олігонуклеотидна мікроматриця або ПЛР). У цих аналізах зонди або праймери можуть також включати маркерні або лінкерні послідовності. Крім того, зонди або праймери можна модифікувати міткою, яку можна детектувати, або спорідненим лігандом, який слід захопити. Альтернативно, при гібридизації на основі способів детекції полінуклеотид, довжина якого становить від декілька сотень (наприклад, приблизно 100-200) основ до декілька тисяч (наприклад, приблизно 1000-2000) основ, можна також застосовувати для зонда (наприклад, нозерн-блот аналіз або аналіз мікроматриці кДНК).

Альтернативно, продукт трансляції можна виявити для діагностування за цим винаходом. Наприклад, можна визначити кількість білка ТОММ34 (SEQ ID NO: 42) або його імунологічного фрагмента. Способи визначення кількості білка як продукту трансляції включають способи імунологічного аналізу, які застосовують антитіло, яке специфічно розпізнає білок. Антитіло може бути моноклональним або поліклональним. Крім того, будь-який фрагмент або модифікацію (наприклад, химерне антитіло, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv тощо) можна застосовувати для детекції, доки фрагмент або модифіковане антитіло зберігає спроможність зв'язуватися з білком ТОММ34. Такі антитіла проти пептидів цього винаходу та їх фрагменти також пропонуються цим винаходом. Способи отримання антитіл цих видів для детекції білків є добре відомими у цій галузі, та будь-який спосіб можна застосовувати у цьому винаході для отримання таких антитіл та їх еквівалентів.

Як інший спосіб детекції рівня експресії гена ТОММ34 на основі його продукту трансляції, можна вимірювати інтенсивність забарвлення за допомогою імуногістохімічного аналізу із застосуванням антитіла проти білка ТОММ34. А саме, при цьому вимірюванні сильне забарвлення вказує на підвищену присутність/рівень білка та одночасно на високий рівень експресії гена ТОММ34.

Рівень експресії цільового гена, наприклад гена ТОММ34, у ракових клітинах можна

визначити як підвищений, якщо рівень зростає порівняно з контрольним рівнем цільового гена (наприклад, рівнем у здорових клітинах) на, наприклад, 10 %, 25 % або 50 %; або зростає у більш ніж 1,1 разу, більш ніж у 1,5 разу, більш ніж у 2,0 рази, більш ніж у 5,0 разів, більш ніж у 10,0 разів або більше.

У контексті цього винаходу контрольний рівень, визначений від біологічного зразка, про який відомо, що він є нераковим, означає "нормальний контрольний рівень". З іншого боку, якщо контрольний рівень визначається від ракового біологічного зразка, то він називається "раковим контрольним рівнем". Різницю між рівнем експресії зразка та контрольним рівнем можна нормалізувати до рівня експресії контрольних нуклеїнових кислот, наприклад, конститутивних генів, про рівні експресії яких відомо, що вони не змінюються залежно від ракового або неракового стану клітини. Приклади контрольних генів включають, проте не обмежуються ними, бета-актин, гліцеральдегід 3 фосфат дегідрогеназу та рибосомний білок Р1.

Контрольний рівень можна визначити одночасно з раковими клітинами, застосовуючи зразок (зразки), які попередньо узяти у суб'єкта/суб'єктів, стан (стани) хвороби (раковий або нераковий) якого (яких) є відомим (відомими), та зберігали. Крім того, як здорові можна застосовувати здорові клітини, узяті з неракових ділянок органа, ураженого раком, який слід лікувати. Альтернативно, контрольний рівень можна визначити за допомогою статистичного способу на основі результатів, отриманих шляхом аналізу попередньо визначеного (визначених) рівня (рівнів) експресії гена ТОММ34 у зразках від суб'єктів, чиї стани хвороби є відомими. Крім того, контрольний рівень можна отримати з бази даних зразків експресії від раніше протестованих клітин. Крім того, згідно з аспектом цього винаходу рівень експресії гена ТОММ34 у біологічному зразку можна порівняти з численними контрольними рівнями, визначеними від численних контрольних зразків. Переважно застосовувати контрольний рівень, визначений від контрольного зразка, що походить від типу тканини, подібного до типу біологічного зразка, узятим від суб'єкта. Крім того, переважно застосовувати стандартне значення рівнів експресії гена ТОММ34 у населення з відомим станом хвороби. Стандартне значення можна отримати за допомогою будь-якого відомого у галузі способу. Наприклад, діапазон в середньому ± 2 S.D. або в середньому ± 3 S.D. можна застосовувати як стандартне значення.

У контексті цього винаходу контрольний рівень, визначений від біологічного зразка, про який відомо, що він є нераковим, означає "нормальний контрольний рівень". З іншого боку, якщо контрольний рівень визначається від ракового біологічного зразка, то він називається "раковим контрольним рівнем".

Коли рівень експресії гена ТОММ34 підвищується порівняно з нормальним контрольним рівнем або він є таким самим/еквівалентним до ракового контрольного рівня, тоді у суб'єкта можна діагностувати рак, який слід лікувати.

Цим винаходом також пропонується спосіб (i) діагностування, чи має суб'єкт рак, який слід лікувати, та/або (ii) вибору суб'єкта для протиракової терапії, при цьому спосіб включає етапи:

а) визначення рівня експресії ТОММ34 у клітинах або тканині (тканинах), узятих у суб'єкта, у якого підозрюють рак, який слід лікувати;

б) порівняння рівня експресії ТОММ34 з нормальним контрольним рівнем;

с) діагностування у суб'єкта ракової хвороби, яку слід лікувати, якщо рівень експресії ТОММ34 є підвищеним порівняно з нормальним контрольним рівнем; та

д) вибір суб'єкта для протиракової терапії, якщо на етапі (с) у суб'єкта діагностували рак, який слід лікувати.

Альтернативно, такий спосіб включає етапи:

а) визначення рівня експресії ТОММ34 у клітинах або тканині (тканинах), узятих у суб'єкта, у якого підозрюють рак, який слід лікувати;

б) порівняння рівня експресії ТОММ34 з раковим контрольним рівнем;

с) діагностування у суб'єкта раку, який слід лікувати, якщо рівень експресії ТОММ34 є подібним або еквівалентним до ракового контрольного рівня; та

д) вибір суб'єкта для протиракової терапії, якщо на етапі (с) у суб'єкта діагностували рак, який слід лікувати.

Цим винаходом також пропонується діагностичний набір для діагностування або визначення суб'єкта, який страждає на рак або у якого підозрюють рак, який можна лікувати поліпептидом ТОММ34 цього винаходу, який може також бути корисним при оцінці прогнозу раку та/або моніторингу ефективності або можливості застосовувати протиракову терапію, зокрема протиракову імунотерапію. Ілюстративні приклади відповідних видів раку включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC,

NSCLC та пухлину м'якої тканини. Детальніше, цей набір переважно включає принаймні один реагент для детекції експресії гена TOMM34 в узятій у суб'єкта клітині, при цьому такий реагент вибраний з наступної групи:

- (a) реагент для детекції мРНК гена TOMM34;
- 5 (b) реагент для детекції білка TOMM34 або його імунологічного фрагмента; та
- (c) реагент для детекції біологічної активності білка TOMM34.

Приклади реагентів, придатних для детектування мРНК гена TOMM34, включають нуклеїнові кислоти, які специфічно зв'язуються з або ідентифікують мРНК TOMM34, такі як олігонуклеотиди, які мають комплементарну послідовність до частини мРНК TOMM34. Прикладами цих типів олігонуклеотидів є праймери та зонди, які є специфічними до мРНК TOMM34. Ці типи олігонуклеотидів можна отримати на основі способів, добре відомих у цій галузі. Якщо необхідно, то реагент для детекції мРНК TOMM34 може бути іммобілізованим на твердій матриці. Крім того, у набір можна включити більш ніж один реагент для детекції мРНК TOMM34.

15 З іншого боку, приклади реагентів, придатних для детектування білка TOMM34 або його імунологічного фрагмента, можуть включати антитіла до білка TOMM34 або його імунологічного фрагмента. Антитіло може бути моноклональним або поліклональним. Крім того, будь-який фрагмент або модифікацію (наприклад, химерне антитіло, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv тощо) цього антитіла можна застосовувати як реагент, доки фрагмент або модифіковане антитіло зберігає спроможність зв'язування з білком TOMM34 або його імунологічним фрагментом. Способи одержання цих різновидів антитіл для детекції білків є добре відомими у цій галузі, та будь-який спосіб можна застосовувати у цьому винаході, щоб отримати такі антитіла та їх еквіваленти. Крім того, антитіло можна помітити молекулами, що генерують сигнал, за допомогою способу прямого зв'язку або способу непрямого мічення. Мітки та способи мічення антитіл та детекції зв'язування антитіл з їх мішенями є добре відомими у цій галузі, та будь-які мітки та способи можна застосовувати для цього винаходу. Крім того, у набір можна включити більш ніж один реагент для детекції білка TOMM34.

Набір може містити більш ніж один з вищезгаданих реагентів. Набір може далі включати тверду матрицю та реагент для зв'язування зонда проти гена TOMM34 або антитіла проти пептиду TOMM34, середовище та контейнер для культивування клітин, позитивні та негативні контрольні реагенти та вторинне антитіло для детекції антитіла проти пептиду TOMM34. Наприклад, зразки тканини, узяті у суб'єктів без раку або суб'єктів, що страждають на рак, можуть служити як корисні контрольні реагенти. Набір цього винаходу може далі включати інші матеріали, які є бажаними з комерційної точки зору та з точки зору користувача та які включають буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци та вкладиші (наприклад, надруковані, на магнітній стрічці, на CD-ROM тощо) з інструкціями для застосування. Ці реагенти та їм подібні можуть зберігатися у контейнері з міткою. Придатні контейнери включають пляшки, ампули та пробірки. Ці контейнери можна виготовити з різноманітних матеріалів, таких як скло або пластик.

40 У варіанті здійснення цього винаходу, коли реагент - це зонд проти мРНК TOMM34, реагент може бути іммобілізованим на твердій матриці, такий як пориста стрічка, для утворення принаймні однієї ділянки детекції. Ділянка вимірювання або детекції пористої стрічки може включати набір ділянок, кожна з яких містить нуклеїнову кислоту (зонд). Тестова стрічка може також містити ділянки для негативних та/або позитивних контрольних. Альтернативно, контрольні ділянки можуть бути розташованими на стрічці окремо від тестової стрічки. Необов'язково, різні ділянки детекції можуть містити різну кількість іммобілізованих нуклеїнових кислот, тобто більшу кількість у першій ділянці детекції та меншу кількість у наступних ділянках. Після додавання тестового зразка кількість ділянок, що виявляють помітний сигнал, кількісно вказує на кількість мРНК TOMM34, яка є присутньою у зразку. Ділянки детекції можуть мати будь-яку придатну для детекції конфігурацію, та вони зазвичай мають форму тире або точки, що перекриває ширину тестової стрічки.

Набір цього винаходу може далі включати позитивний контрольний зразок або стандартний зразок TOMM34. Позитивний контрольний зразок цього винаходу можна отримати шляхом збирання позитивних зразків TOMM34 та наступного аналізу їх рівнів TOMM34. Альтернативно, очищений білок TOMM34 або полінуклеотид можна додати до клітин, які не експресують TOMM34, щоб утворити позитивний зразок або стандартний зразок TOMM34. У цьому винаході очищений TOMM34 може бути рекомбінантним білком. Рівень TOMM34 позитивного контрольного зразка є, наприклад, більшим, ніж порогове значення.

60 В одному варіанті здійснення цим винаходом далі пропонується діагностичний набір, що включає білок або його частковий білок, який специфічно розпізнається антитілом цього

винаходу або його фрагментом.

Приклади часткового пептиду білка цього винаходу включають поліпептиди, які складаються з принаймні 8, переважно 15 та більш переважно 20 замінних амінокислот в амінокислотній послідовності білка цього винаходу. Рак можна діагностувати шляхом детекції антитіла у зразку (наприклад, крові, тканині), застосовуючи білок або пептид (поліпептид) цього винаходу. Способи отримання білка цього винаходу та пептидів є такими, як описано вище.

Цим винаходом пропонуються способи діагностування раку, які можна здійснювати шляхом визначення різниці між кількістю антитіла проти TOMM34 та кількістю у відповідному контрольному зразку, як описано вище. Підозрюють, що суб'єкт страждає на рак, якщо клітини або тканини суб'єкта містять антитіла проти продуктів експресії (TOMM34) гена, та якщо визначають, що кількість антитіла проти TOMM34 перебільшує порогове значення у рівні порівняно зі значенням у здоровому контрольному зразку.

В іншому варіанті здійснення діагностичний набір цього винаходу може включати пептид цього винаходу та молекулу HLA, що зв'язується з ним. Спосіб детекції антиген-специфічних CTL, який застосовує антигенні пептиди та молекули HLA, вже був розроблений (наприклад, Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6). Отже, комплекс пептиду цього винаходу та молекули HLA можна застосовувати для способу детекції з метою виявлення специфічних до пухлинного антигену CTL, що дозволяє раніше виявляти рецидив та/або метастаз раку. Крім того, його можна застосовувати для вибору суб'єктів, до яких можна застосовувати фармацевтичні засоби, включаючи пептид цього винаходу як активний інгредієнт, або для оцінки лікувального ефекту фармацевтичних засобів.

Особливо, згідно з відомим способом (див., наприклад, Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6), можна отримати олігомерний комплекс, такий як тетрамер, міченої радіоактивним ізотопом молекули HLA та пептиду цього винаходу. Застосовуючи цей комплекс, діагностику можна виконувати, наприклад, шляхом кількісного аналізу специфічних до антигену-пептиду CTL у лімфоцитах периферійної крові, узятих у суб'єкта, у якого підозрюють рак.

Цим винаходом далі пропонуються спосіб або діагностичні агенти для оцінки імунологічної реакції суб'єкта, які застосовують пептидні епітопи, як описано у цьому описі винаходу. В одному варіанті здійснення HLA-A2-обмежені пептиди, як описано у цьому описі винаходу, застосовують як реагенти для оцінки або передбачення імунної реакції суб'єкта. Імунну реакцію, яку слід оцінити, індують шляхом контактування імуногена з імунокомпетентними клітинами *in vitro* або *in vivo*. У переважних варіантах здійснення імунокомпетентні клітини для оцінки імунологічної реакції можна вибрати з периферійної крові, лімфоциту периферійної крові (PBL) та мононуклеарів периферійної крові (PBMC). Способи збирання або виділення таких імунокомпетентних клітин є добре відомими у цій галузі. У певних варіантах здійснення як реагент можна застосовувати будь-який агент, наслідком застосування якого може бути виробництво антиген-специфічних CTL, які розпізнають та зв'язуються з пептидним епітопом (епітопами). Пептидний реагент необов'язково застосовується як імуноген. Аналітичні системи, які застосовуються для такого аналізу, включають відносно нові технічні розробки, такі як тетрамери, забарвлення для внутрішньоклітинних лімфокінів та аналізу вивільнення інтерферону або імуноферментні спот-аналізи. У переважному варіанті здійснення імунокомпетентними клітинами, які повинні контактувати з пептидним реагентом, можуть бути антиген-презентуючі клітини, включаючи дендритні клітини.

Наприклад, пептиди цього винаходу можна застосовувати в аналізі тетрамерного забарвлення, щоб оцінити мононуклеари периферійної крові стосовно присутності антиген-специфічних CTL після піддавання впливу антигену пухлинних клітин або імуногена. HLA-тетрамерний комплекс можна застосовувати, щоб безпосередньо спостерігати антиген-специфічні CTL (див., наприклад, Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; і Altman et al, Science 174: 94-96, 1996) та визначити частоту популяції антиген-специфічних CTL у зразку мононуклеарів периферійної крові. Тетрамерний реагент, що застосовує пептид цього винаходу, можна отримати так, як описано далі.

Пептид, що зв'язується з молекулою HLA, повторно згортається у присутності відповідного важкого ланцюга HLA та бета-2-мікроглобуліну, внаслідок чого утворюється тримолекулярний комплекс. У комплексі карбоксильний кінець важкого ланцюга біотинілується на сайті, який попередньо було вбудовано у білок. Після цього додається стрептавідин до комплексу, внаслідок чого утворюється тетрамер, який складається з тримолекулярного комплексу та стрептавідину. Завдяки флюоресцентно міченому стрептавідину цей тетрамер можна застосовувати для забарвлення антиген-специфічних клітин. Ці клітини можна потім ідентифікувати, наприклад, за допомогою проточної цитометрії. Такий аналіз можна застосовувати з метою діагностики або прогнозування. Клітини, ідентифіковані за таким

способом, можна застосовувати для терапевтичних цілей.

Цим винаходом також пропонуються реагенти для оцінки вторинних імунних реакцій (див., наприклад, Bertoni et al, J. Clin. Invest. 100: 503-513, 1997, та Penna et al., J Exp. Med. 174: 1565-1570, 1991), включаючи пептиди цього винаходу. Наприклад, зразки PBMC пацієнта від окремих суб'єктів, що страждають на рак, який слід лікувати, аналізують на присутність антиген-специфічних CTL, застосовуючи специфічні пептиди. Зразок крові, що містить моноклеари, можна оцінити шляхом культивування PBMC та стимулювання клітин пептидом цього винаходу. Після відповідного періоду культивування популяцію розмножених клітин можна проаналізувати, наприклад, стосовно CTL-активності.

Пептиди можна також застосовувати як реагенти для оцінки ефективності вакцини. PBMC, узяті у пацієнта вакцинованого імуногеном, можна проаналізувати, застосовуючи, наприклад, один з вищеописаних способів. Пацієнт має тип HLA, та для аналізу вибираються реагенти епітопних пептидів, що розпізнають алель-специфічні молекули, які є присутніми у такого пацієнта. На імуногенність вакцини може вказувати присутність епітоп-специфічних CTL у зразку PBMC.

Пептиди винаходу можна також застосовувати для отримання антитіл, застосовуючи способи, добре відомі у галузі (див., наприклад, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; та Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), при цьому вони можуть бути корисними як реагенти для діагностування або моніторингу раку. Такі антитіла можуть включати ті антитіла, що розпізнають пептид у контексті молекули HLA, тобто антитіла, які зв'язуються з комплексом пептид-МНС.

Пептиди та композиції цього винаходу мають ряд додаткових варіантів застосування, деякі з яких описано у цьому описі винаходу. Наприклад, цим винаходом пропонується спосіб діагностування або детекції розладу, який характеризується експресією імуногенного поліпептиду TOMM34. Ці способи включають етап визначення рівня експресії пептиду цього винаходу або комплексу пептиду цього винаходу та молекули HLA класу I у біологічному зразку. Експресію пептиду або комплексу пептиду та молекули HLA класу I можна визначити або виявити шляхом аналізу з партнером по зв'язуванню для пептиду або комплексу. У переважному варіанті здійснення партнером по зв'язуванню для пептиду або комплексу є антитіло, яке розпізнає та специфічно зв'язується з пептидом. Експресію TOMM34 у біологічному зразку, такому як біопсія пухлини, можна також проаналізувати за допомогою стандартних протоколів ампліфікації за допомогою ПЛР, застосовуючи праймери TOMM34. Приклад експресії у пухлині представлено у цьому описі винаходу, та подальший опис прикладів умов та праймерів для ампліфікації TOMM34 можна знайти у міжнародній публікації WO2003/27322.

Переважно, діагностичні способи включають етап контактування біологічного зразка, взятого у суб'єкта, з агентом, специфічним до пептиду цього винаходу, для виявлення присутності пептиду цього винаходу у біологічному зразку. Як застосовується у цьому описі винаходу, термін "контактування" означає розташування біологічного зразка у суттєвій близькості до агента та при відповідних умовах, наприклад, концентрації, температури, часу, іонної сили, для того, щоб відбувалася специфічна взаємодія між цим агентом та пептидом цього винаходу, який є присутнім у біологічному зразку. Взагалі, умови контактування агента з біологічним зразком - це умови, які є відомими для звичайних фахівців у цій галузі та які призначені для сприяння специфічній взаємодії між молекулою та її партнером по взаємодії (наприклад, білком та його рецептором, антитілом та його білковим антигеном, нуклеїною кислотою та її комплементарним ланцюгом) у біологічному зразку. Оптимальні умови для сприяння специфічній взаємодії між молекулою та її партнером по взаємодії описано у патенті США № 5,108,921, винахідниками щодо якого є Low et al.

Спосіб діагностики цього винаходу можна здійснювати або *in vivo*, або *in vitro*, або обома цими методами. Відповідно, біологічний зразок може бути розташованим згідно з цим винаходом *in vivo* або *in vitro*. Наприклад, біологічний зразок може бути тканиною *in vivo*, а агент, що є специфічним до імуногенного поліпептиду TOMM34, можна застосовувати для детекції присутності таких молекул у тканині. Альтернативно, біологічний зразок можна взяти або виділити *in vitro* (наприклад, зразок крові, зразок біопсії пухлини, тканинний екстракт). В особливо переважному варіанті здійснення біологічний зразок може бути зразком, що містить клітини, більш переважно зразком, що містить пухлинні клітини, узяті у суб'єкта, якого слід діагностувати або лікувати.

Альтернативно, діагностику можна виконувати за способом, який дозволяє здійснювати прямий кількісний аналіз антиген-специфічних Т-клітин шляхом забарвлення міченими флюоресцеїном мультимерними комплексами HLA (наприклад, Altman, J. D. et al., 1996, Science

274: 94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330). Також пропонуються забарвлення для внутрішньоклітинних лімфокінів та аналізи вивільнення інтерферону-гамма або імуноферментні спот-аналізи. Як виявляється, тетрамерне забарвлення, забарвлення внутрішньоклітинних лімфокінів та імуноферментні спот-аналізи є принаймні у 10 разів більш

чутливими порівняно з більшістю традиційних аналізів (Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8: 413). Можна також застосовувати пентамери (наприклад, US 2004-209295A), декстрамери (наприклад, WO 02/072631) та стрептамери (наприклад, Nature medicine 6, 631-637 (2002)).

Наприклад, у деяких варіантах здійснення цим винаходом пропонується спосіб діагностики

та оцінки імунологічної реакції суб'єкта, якому ввели принаймні один з пептидів TOMM34 цього винаходу, при цьому спосіб включає етапи:

(а) контактування імуногена з імунокомпетентними клітинами за умовою, придатною для індукції CTL, специфічного до імуногена;

(b) детекції або визначення рівня індукції CTL, індукovanого на етапі (а); та

(с) зіставлення імунологічної реакції суб'єкта з рівнем індукції CTL.

У цьому винаході імуноген переважно включає принаймні одне з: (а) пептиду(ів) TOMM34 цього винаходу, наприклад пептидів, що мають амінокислотну послідовність, вибрану серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, та (b) цих же модифікованих пептидів (пептидів, що мають такі амінокислотні послідовності, та пептидів, у яких такі амінокислотні послідовності були модифіковані 1, 2 або більше амінокислотними заміщеннями). В той же час умови, що є придатними для індукції імуноген-специфічного CTL, є добре відомими у галузі. Наприклад, імунокомпетентні клітини можна культивувати *in vitro* у присутності імуногена (імуногенів) з метою індукції імуноген-специфічного CTL. Для того, щоб індукувати імуноген-специфічні CTL, до клітинної культури можна додати будь-які стимулюючі фактори. Наприклад, IL-2 - це переважний стимулюючий фактор для індукції CTL.

У деяких варіантах здійснення етап моніторингу або оцінювання імунологічної реакції суб'єкта, якого слід лікувати за допомогою пептидної протиракової терапії, можна здійснювати до, під час та/або після лікування. Взагалі, під час виконання протоколу протиракової терапії імуногенні пептиди вводяться багаторазово суб'єктові, якого слід лікувати. Наприклад, імуногенні пептиди можна вводити кожного тижня протягом 3-10 тижнів. Отже, імунологічну реакцію суб'єкта можна оцінити або контролювати під час виконання протоколу протиракової терапії. Альтернативно, етап оцінювання або моніторингу імунологічної реакції на ракову терапію можна здійснювати наприкінці протоколу терапії.

Згідно з цим винаходом підвищена індукція імуноген-специфічного CTL порівняно з контрольним рівнем вказує на те, що суб'єкт, якого слід оцінювати або діагностувати, мав імунологічну реакцію на імуноген(-и), який (які) були введені. Придатні контрольні рівні для оцінки імунологічної реакції можуть включати, наприклад, рівень індукції CTL, коли імунокомпетентні клітини контактують з не пептидом або контрольним пептидом (пептидами), який (які) має (мають) амінокислотні послідовності, відмінні від будь-яких пептидів TOMM34 (наприклад, випадкова амінокислотна послідовність). У переважному варіанті здійснення імунологічна реакція суб'єкта оцінюється специфічним до послідовності способом, шляхом порівняння з імунологічною реакцією між кожним імуногеном, введеним суб'єкту. Зокрема, навіть коли суміш деяких видів пептидів TOMM34 вводять суб'єкту, імунологічна реакція може бути різною залежно від пептидів. У цьому випадку шляхом порівняння імунологічної реакції між кожним пептидом можна ідентифікувати пептиди, до яких суб'єкт демонструє найвищу реакцію.

XI. Антитіла

Цим винаходом пропонуються антитіла, які зв'язуються з пептидом цього винаходу. Переважні антитіла специфічно зв'язуються з пептидом цього винаходу, та вони не будуть зв'язуватися (або будуть зв'язуватися слабо) з пептидом, що не є пептидом цього винаходу. Альтернативно, антитіла зв'язуються з пептидом цього винаходу, а також з їх гомологами.

Антитіла проти пептиду цього винаходу можуть знаходити застосування в діагностичних аналізах стосовно раку та аналізах стосовно прогнозування раку, а також в способах візуалізації. Подібно до цього, такі антитіла можуть знаходити застосування при лікуванні, діагностиці та/або прогнозуванні інших видів раку, доки TOMM34 також експресується або надмірно експресується у ракового пацієнта. Крім того, антитіла, що експресуються внутрішньоклітинно (наприклад, одноланцюгові антитіла), є терапевтично корисними при лікуванні різних видів раку, у які залучена експресія TOMM34, приклади яких включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини.

Цим винаходом також пропонуються різні імунологічні аналізи для детекції та/або кількісного аналізу білка TOMM34 (SEQ ID NO: 42) або його фрагментів, включаючи пептиди цього винаходу. Такі аналізи можуть включати одне або більше антитіл проти TOMM34, спроможних розпізнавати та зв'язуватися з білком TOMM34 або його фрагментами, за необхідністю. У контексті цього винаходу антитіла проти TOMM34, що зв'язуються з поліпептидом TOMM34, переважно розпізнають пептиди цього винаходу. Зв'язувальну специфічність антитіла можна підтвердити за допомогою тесту інгібування. Тобто, коли зв'язування між антитілом, яке слід проаналізувати, та поліпептидом TOMM34 повної довжини інгібувалося у присутності пептиду цього винаходу, то це показувало, що це антитіло специфічно зв'язується з цим фрагментом. У контексті цього винаходу такі імунологічні аналізи виконуються в межах різних форматів імунологічних аналізів, які є добре відомими у цій галузі та які включають, проте не обмежуються ними, різні типи радіоімунологічних аналізів, способів імунохроматографії, твердофазних імуоферментних аналізів (ELISA), флуоресцентних імуоферментних аналізів (ELIFA) тощо.

Пов'язані з імунологією, проте не з антитілом, аналізи за цим винаходом також включають аналізи імуногенності Т-клітин (інгібіторні або стимулюючі), а також аналізи зв'язування з головним комплексом гістосумісності (МНС). Крім того, способи імунологічної візуалізації, спроможні виявляти різні види раку, що експресують TOMM34, також пропонуються цим винаходом, та вони включають, проте не обмежуються ними, способи радіосцинтиграфічної візуалізації, які застосовують мічені антитіла цього винаходу. Такі аналізи є клінічно корисними при детекції, моніторингу та прогнозуванні різних видів раку, які експресують TOMM34, та приклади яких включають, проте не обмежуються ними, AML, CML, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак шийки матки, колоректальний рак, рак стравоходу, рак печінки, остеосаркому, рак простати, рак нирки, SCLC, NSCLC та пухлину м'якої тканини.

Цим винаходом пропонуються антитіла, які зв'язуються з пептидом цього винаходу. Антитіло цього винаходу можна застосовувати у будь-якій формі, такій як моноклональні або поліклональні антитіла, і включає антисироватку, отриману шляхом імунізації пептидом винаходу тварини, такої як кроль, усі класи поліклональних та моноклональних антитіл, антитіла людини та гуманізовані антитіла, отримані внаслідок генної рекомбінації.

Пептид цього винаходу, що застосовується як антиген для отримання антитіла, може походити від будь-яких видів тварин, проте переважно походить від ссавця, такого як людина, миша або щур, більш переважно від людини. Пептид, що походить від людини, можна отримати з нуклеотиду або амінокислотних послідовностей, описаних у цьому описі винаходу.

Згідно з цим винаходом пептид, який слід застосовувати як антиген імунізації, може бути повним білком або частковим пептидом білка. Частковий пептид може включати, наприклад, аміно (N)-кінцевий або карбокси (C)-кінцевий фрагмент пептиду цього винаходу.

У цьому описі винаходу антитіло цього винаходу визначається як білок, який реагує або з пептидом TOMM34 повної довжини, або з його фрагментом. У переважному варіанті здійснення антитіло цього винаходу розпізнає фрагмент пептидів TOMM34, які мають амінокислотну послідовність, вибрану серед SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32. Способи синтезування олігопептиду є добре відомими у цій галузі. Після синтезу пептиди можна необов'язково очистити до початку застосування як імуогена. У цьому винаході олігопептид (наприклад, 9- або 10-мер) можна зв'язати або з'єднати з носіями для підвищення імуногенності. Гемоціанін лімфи равлика (KLH) є добре відомим як носій. Способи зв'язування KLH та пептиду є добре відомими у цій галузі.

Альтернативно, ген, що кодує пептид цього винаходу або його фрагмент, можна вставити у відомий вектор експресії, який потім застосовується для трансформування клітини-хазяїна, як описано у цьому описі винаходу. Бажаний пептид або його фрагмент можна потім виділити ззовні або із середини клітин-хазяїнів за допомогою будь-якого стандартного способу, та його можна потім застосовувати як антиген. Альтернативно, суцільні клітини, що експресують пептид, або їхні лізати або хімічно синтезований пептид можна застосовувати як антиген.

Будь-яку тварину-ссавця можна імунізувати антигеном, проте переважно враховується сумісність з первинними клітинами для злиття клітин. Взагалі, застосовують тварин родин гризунів, зайцеподібних або приматів. Тварини родини гризунів включають, наприклад, мишу, щура та хом'ячка. Тварини родини зайцеподібних включають, наприклад, кроля. Тварини родини приматів включають, наприклад, мавпу *Catarrhini* (мавпи), таку як макака *fascicularis*, макака резус, гамадріл та шимпанзе.

Способи імунізації тварин антигенами є добре відомими у цій галузі. Внутрішньочеревна ін'єкція або підшкірна ін'єкція антигенів є стандартним способом імунізації ссавців. Детальніше, антигени можна розвести та суспендувати у відповідній кількості сольового розчину з фосфатним буфером (PBS), фізіологічному сольовому розчині тощо. За бажанням, антигенну

суспензію можна змішати з відповідною кількістю стандартного ад'юванту, такого як повний ад'ювант Фрейнда, утворити емульсію, а потім ввести тваринам-ссавцям. Переважно після цього здійснюється декілька введень антигену, змішаного з відповідною кількістю неповного ад'юванту Фрейнда, кожні 4-21 день. Відповідний носій можна також застосовувати для імунізації. Після імунізації, як описано вище, сироватку досліджують за стандартним способом стосовно збільшення кількості бажаних антитіл.

Поліклональні антитіла проти пептидів цього винаходу можна отримати, узявши кров у імунізованого ссавця, якого досліджують стосовно збільшення бажаних антитіл у сироватці, та шляхом відокремлення сироватки від крові за будь-яким традиційним способом. Поліклональні антитіла можуть включати сироватку, що містить поліклональні антитіла, а також можна виділити з сироватки фракцію, що містить поліклональні антитіла. Імуноглобулін G або M можна отримати з фракції, що розпізнає тільки пептид цього винаходу, застосовуючи, наприклад, колонку для афінної хроматографії, з пептидом цього винаходу, з наступним очищенням цієї фракції із застосуванням колонки білка A або білка G.

Для того, щоб отримати моноклональні антитіла, імунні клітини беруть у ссавця, якого імунізували антигеном, перевіряють стосовно підвищеного рівня бажаних антитіл у сироватці, як описано вище, та ці клітини піддають злиттю. Імунні клітини, що застосовуються для злиття клітин, переважно беруть з селезінки. Інші переважні первинні клітини, які слід злити з вищевказаним імуноцитом, включають, наприклад, клітини мієломи ссавців, а більш переважно клітини мієломи, які мають набуту властивість стосовно вибору злитих клітин за допомогою ліків.

Вищезгаданий імуноцит та клітини мієломи можна злити згідно з відомими способами, наприклад, способом Milstein et al. (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

Отримані внаслідок злиття клітин гібридами можна селектувати шляхом культивування їх у стандартному середовищі селекції, такому як середовище HAT (середовище, що містить гіпоксантин, аміноптерин та тимідин). Клітинну культуру зазвичай витримують у середовищі HAT протягом від декількох днів до декількох тижнів, так щоб вистачило часу для усіх інших клітин, за виключенням бажаної гібридоми, (незлитих клітин), щоб вони загинули. Потім здійснюють стандартне граничне розведення для здійснення скринінгу та клонування гібридомної клітини, що виробляє бажане антитіло.

Окрім вищеописаного способу, при якому тварину, що не є людиною, імунізують антигеном для отримання гібридоми, лімфоцити людини, такі як лімфоцити, інфіковані вірусом EB, можна імунізувати пептидом, клітинами, що експресують пептид, або їх лізатами *in vitro*. Потім імунізовані лімфоцити зливають з похідними від людини клітинами мієломи, які є спроможними необмежено ділитися, такими як U266, внаслідок чого отримують гібридому, що виробляє бажане антитіло людини, яке є спроможним зв'язуватися з пептидом (недосліджена опублікована японська патентна заявка No. (JP-A) Sho 63-17688).

Отримані гібридами потім трансплантуються в черевну порожнину миші, та асцити вилучаються. Отримані моноклональні антитіла можна очистити шляхом, наприклад, осадження з сульфатом амонію, використання колонки білка A або білка G, іонообмінної хроматографії DEAE або колонки для афінної хроматографії, з якою пептид цього винаходу є з'єднаним. Антитіло цього винаходу можна застосовувати не тільки для очищення та детекції пептиду цього винаходу, а його можна застосовувати і як кандидата для агоністів та антагоністів пептиду цього винаходу.

Альтернативно, імунну клітину, таку як імунізований лімфоцит, що виробляє антитіла, можна імпорталізувати онкогеном та застосовувати для отримання моноклональних антитіл.

Отримані таким способом моноклональні антитіла можна також отримати шляхом рекомбінації, застосовуючи способи генної інженерії (див., наприклад, *Borregaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies*, що опубліковано в Сполученому Королівстві видавництвом MacMillan Publishers LTD (1990)). Наприклад, ДНК, що кодує антитіло, можна клонувати із імунної клітини, такої як гібридома або імунізований лімфоцит, що виробляє це антитіло, вставити у відповідний вектор та ввести у клітини-хазяїни з метою отримання рекомбінантного антитіла. Цим винаходом також пропонуються рекомбінантні антитіла, отримані, як описано вище.

Крім того, антитіло цього винаходу може бути фрагментом антитіла або модифікованим антитілом, доки воно зв'язується з одним або більше пептидами цього винаходу. Наприклад, фрагментом антитіла може бути Fab, F(ab')₂, Fv або однокланцюговий Fv (scFv), у якому фрагменти Fv з H- та L-ланцюгів злиті за допомогою відповідного лінкера (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83 (1988)). Детальніше, фрагмент антитіла можна отримати шляхом обробки антитіла ферментом, таким як папаїн або пепсин. Альтернативно, ген, що кодує

фрагмент антитіла, можна побудувати, вставити у вектор експресії та експресувати у відповідній клітині-хазяїні (див., наприклад, Co et al., *J Immunol* 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., *Methods Enzymol* 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7 (1991)).

Антитіло можна модифікувати шляхом зв'язування з різними молекулами, такими як поліетиленгліколь (PEG). Цим винаходом пропонуються такі модифіковані антитіла. Модифіковане антитіло можна отримати шляхом хімічної модифікації антитіла. Ці способи модифікації є традиційними у цій галузі.

Альтернативно, антитіло цього винаходу можна отримати як химерне антитіло, між варіабельною ділянкою, що походить від антитіла не людини, та константною ділянкою, що походить від антитіла людини, або як гуманізоване антитіло, що включає гіперваріабельну ділянку (CDR), що походить від антитіла не людини, каркасну ділянку (FR) та константну ділянку, що походять від антитіла людини. Такі антитіла можна отримати за допомогою відомого способу. Гуманізацію можна здійснювати шляхом заміщення CDR або послідовностями CDR гризунів відповідних послідовностей антитіла людини (дивись, наприклад, Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)). Отже, такі гуманізовані антитіла - це химерні антитіла, де суттєво менший, ніж повний варіабельний домен людини, було заміщено відповідною послідовністю від зразка, що не є людиною.

Можна також застосовувати повністю людські антитіла, які включають варіабельні ділянки людини на додаток до каркасної та константної ділянок людини. Такі антитіла можна отримати, застосовуючи різні відомі у цій галузі способи. Наприклад, способи *in vitro* застосовують рекомбінантні бібліотеки фрагментів антитіл людини, виявлені на бактеріофазі (наприклад, Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991)). Подібно до цього, антитіла людини можна отримати шляхом введення локусу імуноглобуліну людини трансгенним тваринам, наприклад, мишам, у яких ендегенні гени імуноглобуліну були частково або повністю інактивовані. Цей підхід описано, наприклад, у патентах США №№ 6,150,584, 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016.

Антитіла, отримані так, як описано вище, можна очищувати до гомогенності. Наприклад, відокремлення та очищення антитіла можна виконувати згідно зі способами відокремлення та очищення, що застосовуються для загальних білків. Наприклад, антитіла можна відокремити та виділити шляхом відповідного вибору та комбінованого застосування способів колоночної хроматографії, таких як афінна хроматографія, фільтрування, ультрафільтрації, висолювання, діалізу, електрофорезу на поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS) та ізоелектричного фокусування (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), проте не обмежуючись ними. Колонку білка А та колонку білка G можна застосовувати як колонку для афінної хроматографії. Прикладами колонок білка А, які слід застосовувати, є, наприклад, Hyper D, POROS та Sepharose F.F. (Pharmacia).

Приклади підхожих способів хроматографії, за винятком афінної хроматографії, включають, наприклад, іонообмінну хроматографію, гідрофобну хроматографію, гель-фільтрування, хроматографію зі зворотною фазою, адсорбційну хроматографію тощо (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Процедури хроматографії можна здійснювати шляхом рідинно-фазової хроматографії, такої як рідинна хроматографія високого розділення (HPLC) та рідинна хроматографія швидкого розділення (FPLC).

Наприклад, вимірювання абсорбції, твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), імуноферментний аналіз (EIA), радіоімунологічний аналіз (RIA) та/або імуофлуоресценцію можна застосовувати для вимірювання антиген-зв'язувальної активності антитіла цього винаходу. При здійсненні ELISA антитіло цього винаходу іммобілізується на планшеті, пептид винаходу наноситься на планшет, а потім наноситься зразок, що містить бажане антитіло, такий як культуральна надосадова рідина клітин, що виробляють антитіла, або очищені антитіла. Після цього вторинне антитіло, яке розпізнає первинне антитіло та яке є міченим ферментом, таким як лужна фосфатаза, наноситься на планшет, а планшет інкубується. Потім, після промивання, субстрат ферменту, такий як *p*-нітрофеніл фосфат, додають до планшета та вимірюють абсорбцію з метою оцінювання антиген-зв'язувальної активності зразка. Фрагмент пептиду, такий як С-кінцевий або N-кінцевий фрагмент, можна застосовувати як антиген для того, щоб оцінити зв'язувальну активність антитіла. BIAcore (Pharmacia) можна застосовувати для оцінки активності антитіла згідно з цим винаходом.

Вищевказані способи дозволяють здійснювати детекцію або вимірювання пептиду винаходу шляхом піддавання антитіла цього винаходу впливу зразка, про який передбачається, що він

містить пептид цього винаходу, та шляхом детекції або вимірювання імунного комплексу, утвореного антитілом та пептидом.

Оскільки спосіб детекції або вимірювання пептиду згідно з винаходом може специфічно виявляти або вимірювати пептид, то спосіб може бути корисним у різноманітних експериментах, у яких застосовується пептид.

XII. Вектори і клітини-хазяїни

Цим винаходом також пропонуються вектор та клітина-хазяїн, у які вводиться нуклеотид, що кодує пептид цього винаходу. Вектор цього винаходу може бути корисним, щоб утримувати нуклеотид, особливо ДНК, цього винаходу у клітині-хазяїні, експресувати пептид цього винаходу або вводити нуклеотид цього винаходу для генної терапії.

Коли *E. coli* - це клітина-хазяїн, а вектор ампліфікується та виробляється у великій кількості в *E. coli* (наприклад, JM109, DH5 альфа, HB101 або XL1Blue), тоді вектор мусить мати "ori", щоб ампліфікуватися в *E. coli*, та маркерний ген для вибору трансформованих *E. coli* (наприклад, ген стійкості до ліків, який вибирається із застосуванням ліків, таких як ампіцилін, тетрациклін, канаміцин, хлорамфенікол тощо). Наприклад, можна застосовувати вектори серії M13, вектори серії pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script тощо. Крім того, pGEM-T, pDIRECT та pT7 можна також застосовувати для субклонування та екстрагування кДНК, а також векторів, описаних вище. Коли вектор застосовується для отримання білка цього винаходу, тоді вектор експресії є особливо корисним. Наприклад, вектор експресії, який мусить експресуватися в *E. coli*, повинен мати вищевказані характеристики, щоб ампліфікуватися в *E. coli*. Коли *E. coli*, такі як JM109, DH5альфа, HB101 або XL1 Blue, застосовується як клітина-хазяїн, тоді вектор повинен мати промотор, наприклад, промотор lacZ (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), промотор araB (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)), промотор T7 або їм подібне, які можуть ефективно експресувати бажаний ген в *E. coli*. У цьому відношенні замість вищевказаних векторів можна застосовувати, наприклад, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP та pET (у цьому випадку хазяїн - це переважно BL 21, який експресує РНК-полімеразу T7). Крім того, вектор може також містити сигнальну послідовність для секреції пептиду. Приклад сигнальної послідовності, яка спрямовує пептид, який слід секретувати, до периплазми *E. coli*, - це сигнальна послідовність *relB* (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Засоби введення векторів у клітини-хазяїни, що є мішенями, включають, наприклад, спосіб осадження з хлоридом кальцію та спосіб електропорації.

Для виробництва поліпептиду цього винаходу окрім *E. Coli* можна застосовувати, наприклад, вектори експресії, що походять від ссавців (наприклад, pcDNA3 (Invitrogen) та pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), вектори експресії, що походять від клітин комах (наприклад, "система експресії бакуловірусу Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), вектори експресії, що походять від рослин (наприклад, pMH1, pMH2), вектори експресії, що походять від тваринних вірусів (наприклад, pHSV, pMV, pAdexLcw), вектори експресії, що походять від ретровірусів (наприклад, pZIpneo), вектори експресії, що походять від дріжджів (наприклад, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) та вектори експресії, що походять від *Bacillus subtilis* (наприклад, pPL608, pKTH50).

Для того, щоб експресувати вектор у тваринній клітині, такий як клітини CHO, COS або NIH3T3, вектор повинен мати промотор, необхідний для експресії у таких клітинах, наприклад, промотор SV40 (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 альфа (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)), промотор CMV та їм подібні, та переважно маркерний ген для селектування трансформантів (наприклад, ген стійкості до ліків, який вибирається за допомогою ліків (наприклад, неоміцин, G418)). Приклади відомих векторів з цими характеристиками включають, наприклад, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV та pOP13.

Незважаючи на те, що методи та матеріали, подібні або еквівалентні до методів та матеріалів, описаних у цьому описі винаходу, можна застосовувати на практиці або при випробуванні цього винаходу, описуються придатні методи та матеріали. Усі публікації, патентні заявки, патенти та інші посилання, згадані у цьому описі винаходу, включено до нього шляхом посилання у їх повному обсязі. У випадку конфлікту цей опис винаходу, включаючи визначення, буде виконувати регулювальну функцію. Крім того, матеріали, методи та приклади призначені тільки для ілюстрації, а не для обмеження.

Наступні приклади наведено для того, щоб проілюструвати цей винахід, та для того, щоб допомогти звичайному фахівцю у цій галузі зробити та застосовувати таке саме. Приклади не призначені жодним чином обмежувати обсяг цього винаходу.

Приклади

Матеріали та способи

Клітинні лінії

T2, HLA-A*0201-позитивну В-лімфобластоїдну клітинну лінію, та COS7, лінію ниркових клітин африканської зеленої макаки, придбали у ATCC.

Вибір пептидів-кандидатів, що походять від ТОММ34

5 Нонапептиди (9-mer) та декапептиди (10-mer), що походять від ТОММ34, які зв'язуються з молекулою HLA-A*0201, передбачили, застосовуючи при цьому програмне забезпечення для передбачення зв'язування "BIMAS" (http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81)). Ці пептиди синтезували за допомогою Biosynthesis (Lewisville, Texas) згідно зі стандартним способом
10 твердофазного синтезу та очищували шляхом рідинної хроматографії високого розділення (HPLC) зі зворотною фазою. Чистоту (більше 90 %) та ідентичність цих пептидів визначили за допомогою аналітичної рідинної хроматографії високого розділення (HPLC) та мас-спектрометричного аналізу, відповідно. Пептиди розчинили у диметилсульфоксиді (DMSO) до концентрації 20 мг/мл та зберігали при -80 °C.

Індукція CTL in vitro

15 Дендритні клітини (DC), що походять від моноцитів, застосовували як антиген-презентуючі клітини для того, щоб індукувати реакції цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL) проти пептидів, представлених на головному комплексі гістосумісності (HLA). DC генерували in vitro, як описано будь-де (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Стисло кажучи,
20 моноклеари периферійної крові, узяті у здорового волонтера (HLA-A*0201-позитивного) за допомогою розчину Ficoll-Plaque plus (Pharmacia), відокремили за допомогою прилипання до пластикової чашки з тканинною культурою (Becton Dickinson), так щоб збагатити їх як фракцію моноцитів. Збагачену моноцитами популяцію культивували у присутності 1000 одиниць/мл фактору стимуляції колонії гранулоцитів-макрофагів (R&D System) та 1000 одиниць/мл інтерлейкіну (IL)-4 (R&D System) у середовищі AIM-V Medium (Invitrogen), що містить 2 %
25 інактивованої теплою аутогенної сироватки (AS). Після 7 днів культивування індуковані цитокином DC мітили 20 мкг/мл кожного з синтезованих пептидів у присутності 3 мкг/мл бета 2-мікроглобуліну протягом 3 годин при 37 градусах C у середовищі AIM-V. Виявилось, що генеровані клітини експресували DC-асоційовані молекули, такі як CD80, CD83, CD86 та HLA
30 класу II, на своїх клітинних поверхнях (дані не показано). Ці мічені пептидом DC потім інактивували рентгенівським опромінюванням (20 Гр) та змішали у відношенні 1:20 з аутогенними Т-клітинами CD8+, отриманими шляхом позитивного відбору із застосуванням набору CD8 Positive Isolation Kit (Dyna). Ці культури помістили у планшети з 48 комітками (Corning); при цьому кожна комітка містила $1,5 \times 10^4$ мічених пептидом DC, 3×10^5 Т-клітин
35 CD8+ та 10 нг/мл IL-7 (R&D System) у 0,5 мл середовища AIM-V/2 % AS. Через три дні після цього до культур додали IL-2 (CHIRON) до кінцевої концентрації 20 міжнародних одиниць (МО)/мл. На 7 та 14 дні Т-клітини далі стимулювали аутогенними міченими пептидом DC. DC отримували кожного разу таким самим способом, як описано вище. CTL випробували стосовно мічених пептидом Т2-клітин після 3 раунду стимуляції пептидом на 21 день (Tanaka H et al., Br J
40 Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Процедура розмноження CTL

45 CTL розмножували у культурі, застосовуючи спосіб, подібний до способу, описаного Riddell зі співавторами (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23). Всього 5×10^4 CTL суспендували у 25 мл середовища AIM-V/5 % AS з 2 типами В-лімфобластоїдних клітинних ліній людини, інактивованих Мітоміцином C, у присутності 40 нг/мл моноклонального антитіла проти CD3 (Pharmingen). Через один день після ініціювання культур додали до культур 120 МО/мл IL-2. Культури підпитували свіжим
50 середовищем AIM-V/5 % AS, що містило 30 міжнародних одиниць (МО)/мл IL-2, на 5, 8 та 11 день (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Отримання клонів CTL

55 Виконували розведення, щоб отримати 0,3, 1 та 3 CTL/комірку у титраційному мікропланшеті з 96 комітками з круглим дном (Nalge Nunc International). CTL культивували з 2 типами В-лімфобластоїдних клітинних ліній людини при 1×10^4 клітин/комірку, 30 нг/мл антитіла проти CD3 та 125 одиниць/мл IL-2 в загальній кількості 150 мкл/комірку середовища AIM-V, що містило 5 % AS. 50 мкл/комірку IL-2 додали до середовища через 10 днів, так що IL-2 набув кінцевої
60 концентрації 125 одиниць/мл. Активність CTL випробували на 14 день, та клони CTL

розмножили, застосовуючи такий самий спосіб, як описано вище (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Специфічна активність CTL

5 Для того, щоб дослідити активність специфічних CTL, виконували імуноферментний спот-аналіз IFN-гамма (ELISPOT) та твердофазний імуноферментний аналіз IFN-гамма (ELISA). Як клітини-стимулятори приготували мічені пептидом T2-клітини (1×10^4 клітин/комірку). Як клітини-респондери застосовували культивовані клітини у 48 комірках. Імуноферментний спот-аналіз ELISPOT IFN-гамма та аналіз ELISA IFN-гамма виконували згідно з інструкцією виробника.

10 Отримання клітин, що примусово експресують або цільовий ген, або HLA-A02, або їх обох кДНК, що кодує відкриту рамку зчитування цільових генів або HLA-A*0201, ампліфікували шляхом ПЛР. Ампліфікований ПЛР-продукт клонували у вектор експресії. Плазмідні трансфектували у COS7, які є цільовими генами, та HLA-A*0201-нульову клітинну лінію, застосовуючи ліпофектамін 2000 (Invitrogen) згідно з рекомендованими виробником процедурами. Через два дні після трансфекції трансфетовані клітини зібрали версенном (Invitrogen) та застосовували як клітини-стимулятори (5×10^4 клітин/комірку) для аналізу активності CTL.

Результати 1

20 Підвищена експресія TOMM34 при різних видах раку

Глобальні дані щодо профілю генної експресії, отримані від різних видів раку, із застосуванням кДНК-мікроматриці, показали, що експресія TOMM34 (GenBank Accession No. NM_006809; наприклад, SEQ ID No: 42) є підвищеною. Експресія TOMM34 в установленому порядку дійсно підвищилася у 4 з 28 випадків AML, у 4 з 14 випадків CML, у 8 з 11 випадків раку сечового міхура, у 1 з 4 випадків раку молочної залози, у 1 з 5 випадків раку шийки матки, у 12 з 12 випадків колоректального раку, у 5 з 17 випадків раку стравоходу, у 6 з 6 випадків раку печінки, у 1 з 10 випадків остеосаркоми, у 1 з 26 випадків раку простати, у 1 з 19 випадків раку нирки, у 2 з 14 випадків SCLC, у 5 з 20 випадків NSCLC та у 10 з 51 випадка пухлини м'якої тканини порівняно з відповідною здоровою тканиною (таблиця 1).

30

Таблиця 1

Співвідношення випадків, у яких спостерігалось підвищення вмісту TOMM34 у раковій тканині порівняно з відповідною здоровою тканиною.

Вид раку	Співвідношення
AML	4/28
CML	4/14
Рак сечового міхура	8/11
Рак молочної залози	1/4
Рак шийки матки	1/5
Колоректальний рак	12/12
Рак стравоходу	5/17
Рак печінки	6/6
Остеосаркома	1/10
Рак простати	1/26
Рак нирки	1/19
SCLC	2/14
NSCLC	5/20
Пухлина м'якої тканини	10/51

Результати 2

Передбачення пептидів, що зв'язуються з HLA-A02 та походять від TOMM34

- 5 Таблиці 2a та 2b демонструють нонапептиди (9-mer) TOMM34 та декапептиди (10-mer) TOMM34, що зв'язуються з HLA-A02, у порядку зростання афінітету зв'язування. Загалом 40 пептидів з потенційною спроможністю зв'язуватися з HLA-A02 вибрали та досліджували для визначення епітопних пептидів.

Таблиця 2а

Нонапептиди (9-mer), що зв'язуються з HLA-A02 та походять від TOMM34

Положення старту	Амінокислотна послідовність	Показник	SEQ ID NO
30	ALYGRALRV	222.566	1
77	ALALVPFSI	60.51	2
52	VLYSNRAAC	27.026	3
110	TVLQIDDNV	11.034	4
220	LLCSNLESA	9.518	5
230	YSNRALCYL	8.115	6
103	MAYVDYKTV	7.883	7
80	LVPFSIKPL	7.309	8
255	KLDGKNVKA	6.955	9
23	GQYAEASAL	6.931	10
195	VLKEEGNEL	5.211	11
111	VLQIDDNVT	5.194	12
238	LVLKQYTEA	4.101	13
1	MAPKFPDSV	3.058	14
113	QIDDNVTSA	2.577	15
253	ALKLDGKNV	2.434	16
239	VLKQYTEAV	2.028	17
144	LPSIPLVPV	1.775	18
142	LKLPSIPLV	1.398	19
279	SSFADISNL	1.187	20

Таблиця 2b

Декапептиди (10-mer), що зв'язуються з HLA-A02 та походять від TOMM34

Положення старту	Амінокислотна послідовність	Показник	SEQ ID NO
143	KLPSiPLVPV	559.894	21
97	ALEKyPMAYV	56.309	22
79	ALVPiSIKPL	49.134	23
237	YLVlkQYTEA	34.279	24
135	SLGPeWRLKL	21.362	25
219	SLLCsNLESA	20.716	26
238	LVLKqYTEAV	18.757	27
127	RMTRaLMDSL	17.388	28
113	QIDDnVTSAV	15.684	29
241	KQYTeAVKDC	12.975	30
30	ALYGrALRVL	12.893	31
220	LLCSnLESAT	12.668	32
195	VLKEeGNELV	8.314	33
112	LQIDdNVTSA	8.075	34
194	RVLKeEGNEL	6.916	35
299	KLRQeVKQNL	5.682	36
141	RLKLpSIPLV	5.599	37
160	SLPSeNHKEM	4.968	38
175	KETTaTKNRV	4.733	39
186	SAGDvEKARV	3.961	40

Положення старту вказує на номер амінокислотного залишку від N-кінця TOMM34. Показник зв'язування виведений за "BIMAS".

Індукція CTL з передбаченими пептидами від TOMM34, обмежених HLA-A*0201

CTL для тих пептидів, що походять від TOMM34, генерували згідно з протоколами, як описано у розділі "Матеріали та способи". Специфічну до пептидів активність CTL визначили за допомогою імуноферментного спот-аналізу IFN-гамма (ELISPOT) (Фігури 1a-d). Комірки за наступними номерами демонстрували сильне виробництво IFN-гамма порівняно з контрольними комірками: комірка номер #4 з TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) (a), #2 з TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5) (b), #4 з TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) (c) та #2 з TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32) (d).

З іншого боку, ніякої специфічної активності CTL не виявили при стимуляції іншими пептидами, наведеними у Таблицях 2a та 2b, незважаючи на те, що ці пептиди мали можливу зв'язувальну активність з HLA-A*0201. Як типові випадки негативних даних специфічне виробництво IFN-гамма не спостерігалось у CTL, стимульованих TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO: 21) (e). Як результат, це вказує на те, що 4 пептиди, що походять від TOMM34, були вибрані як пептиди, які можуть індукувати сильні CTL.

Отримання лінії та клону CTL проти пептиду, що походить від TOMM34

Клітини, які демонстрували специфічну до пептидів активність CTL, яку визначили шляхом аналізу ELISPOT IFN-гамма у комірці номер #4 з TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), розмножували, та лінію CTL отримали внаслідок процесу розмноження, як описано вище у розділі "Матеріали та способи". Активність CTL цієї лінії CTL вимірили за допомогою аналізу ELISA IFN-гамма (Фігура 2). Лінія CTL демонструвала сильне виробництво IFN-гамма проти клітин-мішеней, мічених відповідним пептидом, порівняно з клітинами-мішенями без мічення пептидом. Крім того, клон CTL отримали шляхом обмежувального розведення від лінії CTL, як описано у розділі "Матеріали та способи", та виробництво IFN-гамма клоном CTL проти клітин-мішеней, мічених пептидом, вимірили за допомогою аналізу ELISA IFN-гамма. Сильне виробництво IFN-гамма спостерігали у клону CTL, стимульованого TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID

NO: 1) (Фігура 3).

Специфічна активність CTL проти клітин-мішеней, що експресують TOMM34 та HLA-A*0201

Отриману лінію CTL, що утворилася проти пептиду TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), досліджували стосовно спроможності розпізнавати клітини-мішені, які експресують TOMM34 та молекулу HLA-A*0201. Клітини COS7, трансфектовані як геном TOMM34 повної довжини, так і геном HLA-A*0201 (специфічна модель для клітин-мішеней, які експресують ген TOMM34 та HLA-A*0201), приготували як клітини-стимулятори, а клітини COS7, трансфектовані або геном TOMM34 повної довжини, або геном HLA-A*0201, використовували як контрольні. На Фігурі 4 показано, що лінія CTL, стимульована TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), демонструвала сильну активність CTL проти COS7, що експресують як TOMM34, так і HLA-A*0201. З іншого боку, ніякої суттєвої специфічної активності CTL не визначили проти контрольних клітин. Отже, ці дані ясно продемонстрували, що пептид TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) ендегенно оброблявся та був представлений на клітинах-мішенях молекулою HLA-A*0201 та розпізнавався CTL. Ці результати показують, що цей пептид, що походить від TOMM34, може бути придатним як протиракова вакцина для пацієнтів з пухлинами, що експресують TOMM34.

Аналіз гомології антигенних пептидів

CTL, стимульовані TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) та TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32), демонстрували суттєву та специфічну активність CTL. Цей результат може бути наслідком того факту, що послідовності TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) та TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32) є гомологічними до пептиду, що походить від інших молекул, про які відомо, що вони сенсibiliзують імунну систему людини. Щоб виключити цю можливість, для цих пептидних послідовностей виконували аналізи гомології, застосовуючи як запит алгоритм BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), який не виявив жодної послідовності з суттєвою гомологією. Результати аналізів гомології вказують на те, що послідовності TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) та TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32) є унікальними, та, отже, наскільки нам відомо, існує лише невелика ймовірність, що ці молекули викликають ненавмисну імунологічну реакцію до деякої непов'язаної молекули.

На завершення, ідентифікували новітні епітопні пептиди HLA-A*0201, які походять від TOMM34. Крім того, результати цієї роботи демонструють, що епітопний пептид TOMM34 може бути придатним для застосування у раковій імунотерапії.

Промислова придатність

Цим винаходом пропонуються нові TAA, особливо ті TAA, що походять від TOMM34, які можуть індукувати сильні та специфічні протипухлинні імунні реакції та можуть застосовуватися до широкого спектру типів раку. Такі TAA є корисними як пептидні вакцини проти захворювань, пов'язаних з TOMM34, наприклад, раку, конкретніше, AML, CML, раку сечового міхура, раку молочної залози, раку шийки матки, колоректального раку, раку стравоходу, раку печінки, остеосаркоми, раку простати, раку нирки, SCLC, NSCLC та пухлини м'якої тканини.

Незважаючи на те, що цей винахід докладно описаний у цьому описі винаходу з посиланням на його специфічні варіанти здійснення, слід розуміти, що наведений вище опис є лише прикладом та поясненням за своєю природою, та він призначений для того, щоб проілюструвати цей винахід та його переважні варіанти здійснення. Завдяки рутинним експериментам фахівець у цій галузі легко зрозуміє, що у винаході можна зробити різні зміни та модифікації, при цьому не відхиляючись від духу та обсягу цього винаходу, границі та зв'язки якого визначаються формулою винаходу, що додається.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Онкотерапі Саєнс, Інк.

<120> ПЕПТИДИ ТОММ34 ТА ВАКЦИНИ, ЩО ЇХ МІСТЯТЬ

<130> ONC-A1035P

<150> US 61/419,181

<151> 2010-12-02

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 10
 <400> 1
 Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val
 1 5
 15
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 25
 <400> 2
 Ala Leu Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile
 1 5
 30
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 3
 40
 Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys
 1 5
 45
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 50
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 4
 55
 Thr Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val
 1 5
 60
 <210> 5
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

 <400> 5

 Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala
 10 1 5

 <210> 6
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 20
 <400> 6

 Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu
 25 1 5

 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 35
 <400> 7

 Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val
 40 1 5

 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

 <400> 8
 50
 Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
 1 5

 55 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 60 <220>

<223> штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 9

5 Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala
1 5

<210> 10
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 15 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 10

Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu
 20 1 5

<210> 11
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

30 <400> 11

Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
 35 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

45 <400> 12

Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr
 1 5

50 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

55 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 13

60

Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala
1 5

5 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 14

15 Met Ala Pro Lys Phe Pro Asp Ser Val
1 5

20

<210>	15
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Штучна послідовність

25 <220>
<223> штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 15

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala
30 1 5

35	<210>	16
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Штучна послідовність

40

<220>	
<223>	штучно синтезована пептидна послідовність
<400>	16

Ala Leu Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val
1 5

	<210>	17
	<211>	9
	<212>	PRT
50	<213>	Штучна послідовність

<220>
<223> штучно синтезована пептидна послідовність

55 <400> 17

Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
1 5

60

5 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

 10 <400> 18

 Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val
 1 5

 15 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 20 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

 <400> 19

 25 Leu Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val
 1 5

 30 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 35 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

 <400> 20

 40 Ser Ser Phe Ala Asp Ile Ser Asn Leu
 1 5

 45 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 50 <400> 21

 Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val
 1 5 10
 55

 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 5 <400> 22
 Ala Leu Glu Lys Tyr Pro Met Ala Tyr Val
 1 5 10
 10
 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 15
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 23
 20
 Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
 1 5 10
 25
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 24
 35
 Tyr Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala
 1 5 10
 40
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 25
 50
 Ser Leu Gly Pro Glu Trp Arg Leu Lys Leu
 1 5 10
 55
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 60 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 26
 Ser Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala
 1 5 10
 5
 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 15 <400> 27
 Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
 1 5 10
 20
 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 30 <400> 28
 Arg Met Thr Arg Ala Leu Met Asp Ser Leu
 1 5 10
 35 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 29
 45 Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala Val
 1 5 10
 50 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 55 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 30
 60 Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val Lys Asp Cys
 1 5 10

5 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

15 <400> 31
 Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val Leu
 1 5 10

20 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

25 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

30 <400> 32
 Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala Thr
 1 5 10

35 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

40 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

45 <400> 33
 Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu Val
 1 5 10

50 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

55 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

60 <400> 34
 Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala
 1 5 10

 <210> 35
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

 <400> 35

 Arg Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
 10 1 5 10

 <210> 36
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність
 20
 <400> 36

 Lys Leu Arg Gln Glu Val Lys Gln Asn Leu
 25 1 5 10

 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

 <400> 37

 Arg Leu Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val
 1 5 10
 40
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 45
 <220>
 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

 <400> 38
 50
 Ser Leu Pro Ser Glu Asn His Lys Glu Met
 1 5 10

 55 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 60 <220>

<223> штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 39

5 Lys Glu Thr Thr Ala Thr Lys Asn Arg Val
1 5 10

<210> 40

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

15 <223> штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 40

20 Ser Ala Gly Asp Val Glu Lys Ala Arg Val
1 5 10

<210> 41

<211> 2066

25 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 41

30 aggtctcgca gggccgccc cctcgccgcg ggttcgctgt tgggaggaga tattcgccgc 60

cggcgcttgc gcccgaagg tgtccgcac cacacggggg aggaaggaag gagctcccaa 120

ctcgccggcc tggccacggg atggcccca aattccaga ctctgtggag gagctccgcg 180

35 ccgccggcaa tgagagtttc cgcaacggcc agtacgccga ggcctccgcg ctctacggcc 240

gcgcgctgcg ggtgtgcag gcgcaagggt cttcagacc agaagaaga agtgttctct 300

40 actccaaccg agcagcatgt cactgaagg atggaaactg cagagactgc atcaaagatt 360

gcacttcagc actggccttg gttccctca gcattaagcc cctgctgagg cgagcatctg 420

cttatgaggc tctggagaag taccctatgg cctatgttga ctataagact gtgctgcaga 480

45 ttgatgataa tgtgacgtca gccgtagaag gcatcaacag aatgaccaga gctctcatgg 540

actcgcttgg gcctgagtg gcgctgaagc tgcctcaat ccccttggtg cctgtttcag 600

ctcagaagag gtggaattcc ttgcctcgg agaaccaca agagatggct aaaagcaaat 660

50 ccaaagaaac cacagctaca aagaacagag tgccttctgc tggggatgtg gagaaagcca 720

gagttctgaa ggaagaaggc aatgagcttg taaagaagg aaaccataag aaagctattg 780

55 agaagtacag tgaaagcctc ttgttagta acctggaatc tgccacgtac agcaacagag 840

cactctgcta ttggctcctg aagcagtaca cagaagcagt gaaggactgc acagaagccc 900

tcaagctgga tggaaagaac gtgaaggcat tctacagacg ggctcaagcc cacaagcac 960

60

tcaaggacta taaatccagc ttgcagaca tcagcaacct cctacagatt gagcctagga 1020
atggtcctgc acagaagttg cggcaggaag tgaagcagaa cctacactaa aaaccaaca 1080
5 gggcaactgg aaccctgcc tgacctacc cagagaagcc atgggccacc tgctctgtgc 1140
ccgctcctga aaccagcat gcccgaagt agctctgaag cccctcctc aatccctga 1200
10 tggcctcca cctgtaaga ggcttgctt gttcaaatta aactcagtgt agtcaaacac 1260
agacatggtt gttgcaccag aaaggtcccc actagagcta agcgtgaagc tgaagctctg 1320
tccctattcc ccagcccag ctactgtatc acaccaacag atcctcatca gcaaagcatt 1380
15 tggcttgc ctgccaagt gggctgcaga ctgagtgtc ccctgtagc tccccagac 1440
cccaactcac tgagttcat ctgaacaacc tgagctcctg ggccgggggtg gaaggagggg 1500
gataaaccta aggcctgat ccaagcagc ctgttgagct ggttctccag ggctgcagtc 1560
20 tctccagggtg tacagctgtc gtcctgccc tgcctgtcc ttgcacagtc tctatgtct 1620
gagccccagt gccttctgtt cgggccctcc ttggtggga aggcagagcc ctgaccctg 1680
25 aatggtgtc ctgactctg tgctgtgcc ttctgcagag aggcaccta gctgtttaa 1740
gagcccagt attgtggctg ctctcctag aggtgggagg gggcaagagg cctccttgtt 1800
cagtgtccat gcttctggg cagggacttg gtttttgtt ccaacagtgg ccttctccg 1860
30 gctcatagt tcttgaat atgtgaagt taattgaat tgactgatt tgtgaactg 1920
tgtgttaag ctgttcatt aaaaagctt ctctacatc aatatctgt gtgcttcat 1980
35 ttatgcctt tcagcttgc acctggaact ctgtagtaat aataaaagtt attgcttatt 2040
gggcattcaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2066

40 <210> 42
<211> 309
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 42

Met Ala Pro Lys Phe Pro Asp Ser Val Glu Glu Leu Arg Ala Ala Gly
1 5 10 15

50 Asn Glu Ser Phe Arg Asn Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu Tyr
20 25 30

55 Gly Arg Ala Leu Arg Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Ser Asp Pro Glu
35 40 45

60 Glu Glu Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys His Leu Lys Asp
50 55 60

5	Gly Asn Cys Arg Asp Cys Ile Lys Asp Cys Thr Ser Ala Leu Ala Leu	65	70	75	80
10	Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu Leu Arg Arg Ala Ser Ala Tyr Glu	85	90	95	
15	Ala Leu Glu Lys Tyr Pro Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val Leu	100	105	110	
20	Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala Val Glu Gly Ile Asn Arg Met	115	120	125	
25	Thr Arg Ala Leu Met Asp Ser Leu Gly Pro Glu Trp Arg Leu Lys Leu	130	135	140	
30	Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val Ser Ala Gln Lys Arg Trp Asn Ser	145	150	155	160
35	Leu Pro Ser Glu Asn His Lys Glu Met Ala Lys Ser Lys Ser Lys Glu	165	170	175	
40	Thr Thr Ala Thr Lys Asn Arg Val Pro Ser Ala Gly Asp Val Glu Lys	180	185	190	
45	Ala Arg Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu Val Lys Lys Gly Asn	195	200	205	
50	His Lys Lys Ala Ile Glu Lys Tyr Ser Glu Ser Leu Leu Cys Ser Asn	210	215	220	
55	Leu Glu Ser Ala Thr Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu Val Leu	225	230	235	240
60	Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val Lys Asp Cys Thr Glu Ala Leu Lys Leu	245	250	255	
	Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala Phe Tyr Arg Arg Ala Gln Ala His Lys	260	265	270	
	Ala Leu Lys Asp Tyr Lys Ser Ser Phe Ala Asp Ile Ser Asn Leu Leu	275	280	285	
	Gln Ile Glu Pro Arg Asn Gly Pro Ala Gln Lys Leu Arg Gln Glu Val	290	295	300	

	Lys Gln Asn Leu His	
5	305	
	<210> 43	
	<211> 22	
10	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Штучна послідовність	
15	<400> 43	
	gtctaccagg cattcgcttc at	22
	<210> 44	
20	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
25	<223> Штучна послідовність	
	<400> 44	
	tcagctggac cacagccgca gcgt	24
30	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
35	<220>	
	<223> Штучна послідовність	
	<400> 45	
40	tcagaaatcc ttctcttga c	21
	<210> 46	
	<211> 24	
45	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Штучна послідовність	
50	<400> 46	
	ctagcctctg gaatccttc tcct	24

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 55
- Виділений пептид з менше ніж 15 амінокислот, де пептид вибраний з групи, що складається з наступних (а) та (б):
 (а) виділений пептид, який включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, та

(b) виділений пептид, який включає амінокислотну послідовність, в якій одна або дві амінокислоти заміщені або додані до амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32, щоб одержати модифікований пептид, який має здатність індукувати цитотоксичний Т-лімфоцит (CTL).

5 2. Пептид за п. 1, який має принаймні одне заміщення, вибране з групи, що складається з наступних характеристик:

(a) друга амінокислота від N-кінця є вибраною з групи, що складається з лейцину та метіоніну, або є модифікованою так, щоб бути амінокислотою, вибраною з групи, що складається з лейцину та метіоніну; та

10 (b) амінокислота на C-кінці є вибраною з групи, що складається з валіну та лейцину, або є модифікованою так, щоб бути амінокислотою, вибраною з групи, що складається з валіну та лейцину.

3. Виділений пептид за п. 1 або 2, де згаданий пептид - це нонапептид або декапептид.

15 4. Виділений пептид за п. 3, де пептид складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 5, 31 та 32.

5. Виділений полінуклеотид, що кодує пептид за будь-яким з пп. 1-4.

6. Композиція для індукування CTL, де ця композиція містить один або більше пептидів за будь-яким з пп. 1-4 або один або більше полінуклеотидів за п. 5.

7. Фармацевтична композиція, яка містить:

20 (a) один або більше пептидів за будь-яким з пп. 1-4;

(b) один або більше полінуклеотидів за п. 5;

(c) одну або більше антиген-презентуючих клітин (APC) або екзосом, що презентують комплекс пептиду за будь-яким з пп. 1-4 та антигену HLA на своїй поверхні; або

25 (d) один або більше CTL, що розпізнають клітину, яка презентує комплекс пептиду за будь-яким з пп. 1-4 та антигену HLA на своїй поверхні,

в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, виготовлена для цілі, вибраної з групи, що складається з:

(i) лікування існуючого раку,

(ii) профілактики раку,

30 (iii) попередження післяопераційного рецидиву раку та

(iv) їх комбінацій.

8. Фармацевтична композиція за п. 7, яка виготовлена для введення суб'єктові, антиген HLA якого являє собою HLA-A2.

35 9. Спосіб індукування антиген-презентуючої клітини (APC) зі здатністю індукувати CTL, де спосіб включає етап, вибраний з групи, що складається з:

(a) контактування APC з пептидом за будь-яким з пп. 1-4 in vitro, ex vivo або in vivo та

(b) введення полінуклеотиду, що кодує пептид за будь-яким з пп. 1-4, у APC.

10. Спосіб індукування CTL, який включає етап, вибраний з групи, що складається зі:

40 (a) спільного культивування CD8-позитивної Т-клітини та APC, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким з пп. 1-4;

(b) спільного культивування CD8-позитивної Т-клітини та екзосоми, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким з пп. 1-4; та

45 (c) введення у Т-клітину полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують поліпептиди субодиниці рецептора Т-клітин (TCR), де TCR, утворений згаданими поліпептидами субодиниці TCR, здатний зв'язуватися з комплексом антигену HLA та пептиду за будь-яким з пп. 1-4 на клітинній поверхні.

11. Виділена APC, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким з пп. 1-4.

50 12. APC за п. 11, індукована за способом індукування антиген-презентуючої клітини (APC) зі здатністю індукувати CTL, при цьому спосіб включає етап, вибраний з групи, що складається з:

(a) контактування APC з пептидом за будь-яким з пп. 1-4 in vitro, ex vivo або in vivo та

(b) введення полінуклеотиду, що кодує пептид за будь-яким з пп. 1-4, у APC.

13. Виділений CTL, який націлений на пептид за будь-яким з пп. 1-4.

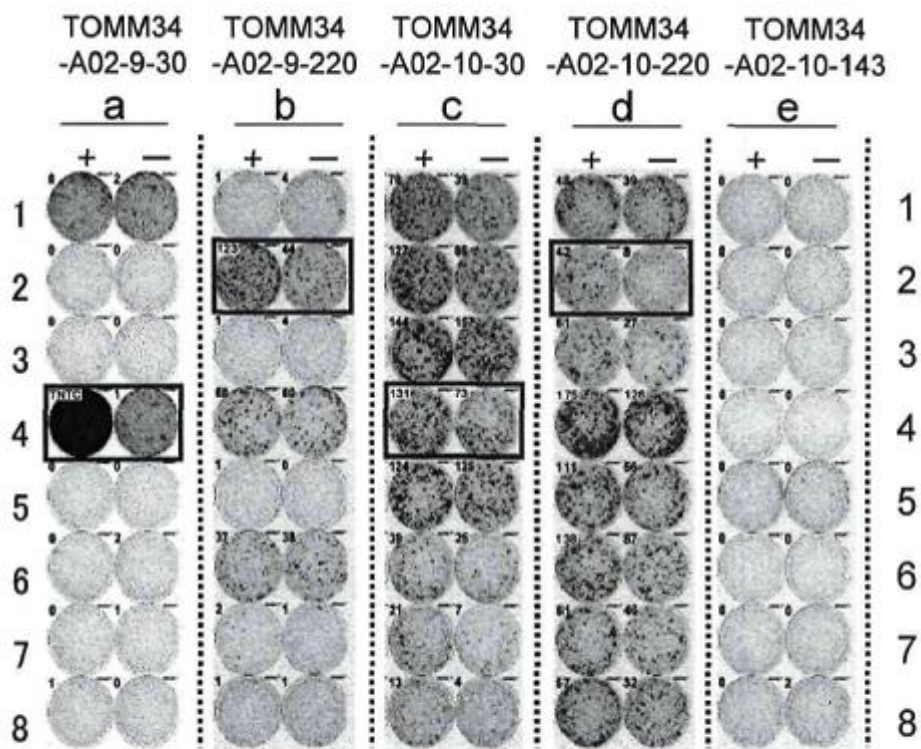
55 14. CTL за п. 13, індукований за способом індукування CTL, при цьому спосіб включає етап, вибраний з групи, що складається зі:

(a) спільного культивування CD8-позитивної Т-клітини та APC, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким з пп. 1-4;

(b) спільного культивування CD8-позитивної Т-клітини та екзосоми, яка презентує на своїй поверхні комплекс антигену HLA та пептиду за будь-яким з пп. 1-4; та

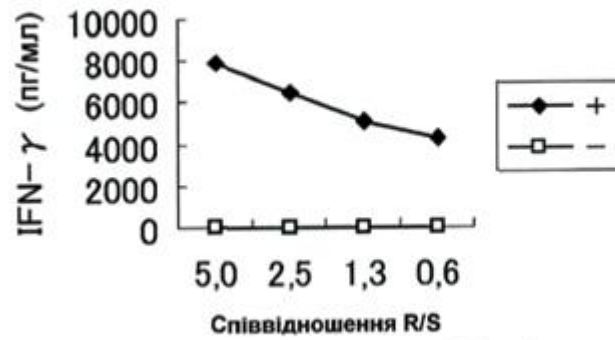
(с) введення у Т-клітину полінуклеотиду/полінуклеотидів, що кодують поліпептиди субодиноці рецептора Т-клітин (TCR), де TCR, утворений згаданими поліпептидами субодиноці TCR, здатний зв'язуватися з комплексом антигену HLA та пептиду за будь-яким з пп. 1-4 на клітинній поверхні.

- 5 15. Спосіб індукування імунної реакції проти раку у суб'єкта, який включає етап введення суб'єктові пептиду за пп. 1-4, його імунологічно активного фрагмента або полінуклеотиду, що кодує цей пептид або фрагмент.
16. Вектор, який включає нуклеотидну послідовність, що кодує пептид за будь-яким з пп. 1-4.
17. Клітина-хазяїн, трансформована або трансфектована вектором експресії за п. 16.
- 10 18. Екзосома, яка презентує комплекс, що включає пептид за будь-яким з пп. 1-4 та антиген HLA.
19. Антитіло або його імунологічно активний фрагмент проти пептиду за будь-яким з пп. 1-4.
- 20 20. Діагностичний набір, який включає пептид за будь-яким з пп. 1-4, полінуклеотид за п. 5 або антитіло або імунологічно активний фрагмент за п. 19.
- 15 21. Застосування пептиду за будь-яким з пп. 1-4 або полінуклеотиду за п. 5 для виробництва композиції для індукування APC.
22. Застосування будь-якого з нижченаведених (а)-(d) для виробництва композиції для індукування CTL:
(а) одного або більше пептидів за будь-яким з пп. 1-4;
20 (b) одного або більше полінуклеотидів за п. 5;
(с) однієї або більше APC за п. 11 або
(d) однієї або більше екзосом за п. 18.



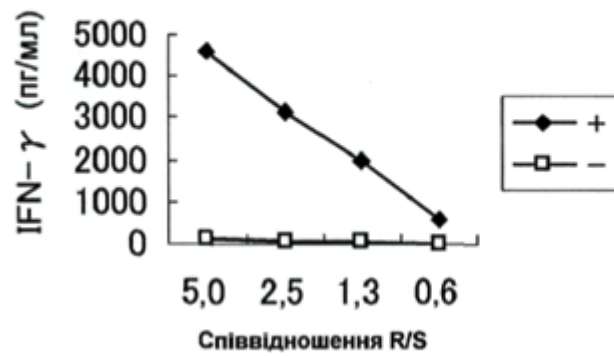
Фіг. 1

TOMM34-A02-9-30 #4



Фиг. 2

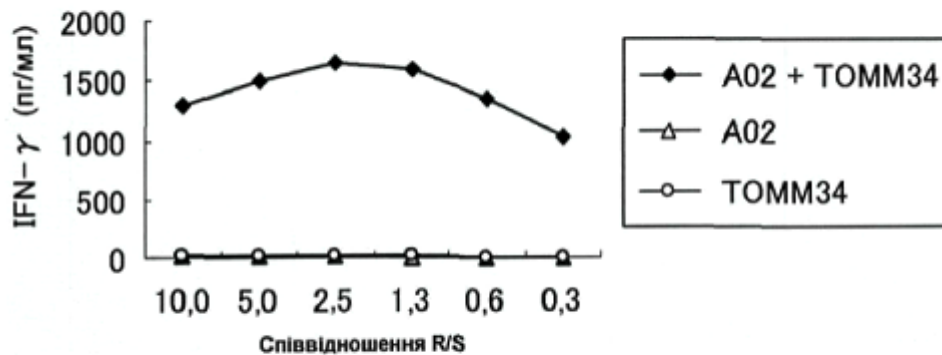
TOMM34-A02-9-30 #4-105



Фиг. 3

TOMM34-A02-9-30

лінія CTL



Фиг. 4

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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