

Sammensetning av tumorassosierte peptider og beslektet anti-kreftvaksine for behandling av glioblastom (GBM) og andre kreftformer

5 Den foreliggende oppfinnelsen vedrører immunterapeutiske peptider og deres
anvendelse i immunterapi, særlig immunterapien av kreft. Den foreliggende
oppfinnelsen vedrører spesielt en farmasøytisk sammensetning omfattende et
peptid som består av aminosyresekvensen med SEQ ID NO 2, og et peptid som
10 består av aminosyresekvensen med SEQ ID NO 3, og en farmasøytisk
akseptabel bærer. Nærmere bestemt kan sammensetningen av peptidene ifølge
den foreliggende oppfinnelsen anvendes i vaksinesammensetninger for å
frembringe anti-tumorimmunresponser mot gliomer.

Bakgrunn for oppfinnelsen

15 Gliomer er hjernetumorer som stammer fra gliaceller i nervesystemet. Gliaceller,
ofte kalt nevroglia eller rett og slett glia, er ikke-nevronale celler som
tilveiebringer støtte og ernæring, opprettholder homeostase, danner myelin, og
deltar i signaloverføring i nervesystemet. De to viktigste undergruppene av
20 gliomer er astrocytomer og oligodendrogliomer, oppkalt etter den normale
gliacelletypen som de stammer fra (henholdsvis astrocytter eller
oligodendrocytter). Glioblastoma multiforme (heretter referert til som
glioblastom) hører til i undergruppen av astrocytomer og er den vanligste
ondartede hjernetumoren hos voksne og står for ca. 40 % av alle ondartede
25 hjernetumorer og ca. 50 % gliomer (CBTRUS, 2006). Det invaderer
sentralnervesystemet aggressivt og er rangert på det høyeste ondartethetsnivået
(klasse IV) blant alle gliomer. Selv om det har vært jevn fremgang i deres
behandling som følge av forbedringer i nevrobillediagnostikk, mikrokirurgi, ulike
behandlingsalternativer, som for eksempel temozolomid eller stråling, er
30 glioblastomer fortsatt uhelbredelig (Macdonald, 2001; Burton and Prados, 2000;
Prados and Levin, 2000). Dødelighetsraten for denne hjernetumoren er svært
høy: gjennomsnittlig levealder er 9 til 12 måneder etter første diagnose. 5-års
overlevelsesraten i observasjonsperioden fra 1986 til 1990 var 8,0 %. Til dags
dato er femårsoverlevelsesraten etter aggressiv terapi inkludert stor
35 tumorreseksjon fortsatt mindre enn 10 % (Burton and Prados, 2000; Nieder et
al., 2000; Napolitano et al., 1999; Dazzi et al., 2000). Følgelig er det et sterkt
medisinsk behov for en alternativ og effektiv terapeutisk fremgangsmåte.

Tumorceller av glioblastomer er de mest udifferensierte blant hjernetumorer, slik at tumorcellene har stort potensiale for migrasjon og proliferasjon, og er meget inngripende, og gir svært dårlig prognose. Glioblastomer fører til død på grunn av rask, aggressiv, og infiltrerende vekst i hjernen. Det infiltrerende vekstmønsteret er ansvarlig for den ikke-resekterbare arten av disse tumorene. Glioblastomer er også relativt motstandsdyktige mot stråling og kjemoterapi, og derfor er etterbehandlingstilbakefallsratene høye. I tillegg er immunresponsen til de neoplastiske cellene heller ineffektiv til fullstendig utrydding av alle neoplastiske celler etter reseksjon og strålebehandling (Roth and Weller, 1999; Dix et al., 1999; Sablotzki et al., 2000).

Glioblastomer klassifiseres i primær glioblastom (de novo) og sekundær glioblastom, avhengig av forskjeller i genmekanismen under malign transformasjon av udifferensierte astrocytter eller gliaforløperceller. Sekundær glioblastom forekommer hos den yngre populasjonen på opptil 45 år. I løpet av 4 til 5 år, i gjennomsnitt, utvikler sekundær glioblastom seg fra astrocytom av lavere grad gjennom udifferensiert astrocytom. Til forskjell oppstår primær glioblastom hovedsakelig hos den eldre populasjonen med en gjennomsnittsalder på 55 år. Vanligvis oppstår primær glioblastom som fulminant glioblastom preget av tumorprogresjon innen 3 måneder fra tilstanden med ingen kliniske eller patologiske forandringer (Pathology and Genetics of the Nervous Systems. 29-39 (IARC Press, Lyon, France, 2000)).

Glioblastom migrerer langs formidlede nerver og sprer seg bredt i det sentrale nervesystemet. I de fleste tilfeller viser kirurgisk behandling bare begrenset vedvarende terapeutisk effekt (Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 34, 91-94, 1994; Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 33, 425-458, 1993; Neuropathology 17, 186-188, 1997) (Macdonald, 2001; Prados and Levin, 2000).

Ondartede gliomceller unngår å bli oppdaget av vertens immunsystem ved å produsere immunosuppressive midler som svekker T-celleproliferasjon og produksjon av det immunstimulerende cytokinet IL-2 (Dix et al., 1999).

Intrakraniale neoplasmer kan oppstå fra hvilken som helst av strukturene eller celletypene som er til stede i sentralnervesystemet, inkludert hjernen, hjernebinnene, hypofysen, skallen, og til og med det restembryonale vevet. Den

samlede årlige forekomsten av primære hjernetumorer i USA er 14 tilfeller per 100 000. De vanligste primære hjernetumorene er meningeomer, som representerer 27 % av alle primære hjernetumorer, og glioblastomer, som representerer 23 % av alle primære hjernetumorer (mens glioblastomer står for 40 % av ondartede hjernetumorer hos voksne). Mange av disse tumorene er aggressive og av høy klasse. Primære hjernetumorer er de vanligste faste tumorene hos barn og den nest hyppigste årsaken til kreftdød etter leukemi hos barn.

Søket etter effektiv behandling av glioblastomer hos pasienter pågår fortsatt i dag. Immunterapi, eller behandling via rekruttering av immunsystemet, for å bekjempe disse neoplastiske cellene, er blitt undersøkt. De første oppmuntrende resultatene ble oppnådd av Northwest Therapeutics «DCVax Brain» for behandling av glioblastom i immunterapeutiske studier på mennesker, der de antigenspesifikke CTL-responsene kunne induseres og føre til forlengede gjennomsnittlige overlevelsestider sammenlignet med det som ble oppnådd ved å anvende standard behandling ledsaget med minimal toksisitet (Heimberger et al., 2006).

Kolorektalt karsinom

Ifølge American Cancer Society, er kolorektalkreft (CRC) den tredje vanligste kreftformen i USA, og rammer mer enn 175 000 nye pasienter hvert år. I USA, Japan, Frankrike, Tyskland, Italia, Spania og Storbritannia, rammer det mer enn 480 000 pasienter. Det er en av de vanligste årsakene til kreftdødelighet i utviklede land. Forskning tyder på at utbruddet av kolorektalkreft er et resultat av samspillet mellom arvelige og miljømessige faktorer. I de fleste tilfeller ser adenomatøse polypper ut til å være forløpere til kolorektale tumorer; men overgangen kan ta mange år. Den primære risikofaktoren for kolorektalkreft er alderen, der 90 % av tilfellene blir diagnostisert i alderen over 50 år. Andre risikofaktorer for kolorektalkreft i henhold til American Cancer Society inkluderer alkoholforbruk, en diett med høy andel av fett og/eller rødt kjøtt og et utilstrekkelig inntak av frukt og grønnsaker. Forekomsten fortsetter å stige, spesielt i områder som Japan, der innføringen av vestlige dietter med overflødig fett- og kjøttinntak og en reduksjon i fiberinntak kan være årsaken. Imidlertid stiger ikke insidensratene like raskt som tidligere som kan være på grunn av økende screening og polypfjerning, og forhindrer dermed progresjon av polypper til kreft. Som i de fleste faste tumorer, er førstelinjebehandling kirurgi, men dens fordeler forblir begrenset til pasienter på et tidlig stadium, men likevel

diagnostiseres en betydelig andel av pasientene i fremskredne stadier av sykdommen. For fremskreden kolorektalkreftkjemoterapi er regimer basert på fluorouracilbaserte regimer standard pleie. Flesteparten av disse regimene er de såkalte FOLFOX- (som infusjon 5-FU/leukovorin pluss oksaliplatin) og FOLFIRI- (irinotekan, leukovorin, bolus og kontinuerlig infusjon av 5-FU) protokollene.

Innføringen av tredje generasjons cytotoksika så som irinotekan og oksaliplatin har hevet håpet om betydelig å bedre effekten, men prognosen er fortsatt relativt dårlig, og overlevelsesraten forblir generelt på omtrent 20 måneder i metastatisk sykdom, og som et resultat, forblir de udekkede behovene i sykdommen høy.

Nylig ble en ny generasjon av legemidler, molekylmålrettede midler, så som Avastin (bevacizumab) og Erbitux (cetuximab) tilgjengelig, og ca. 40 forbindelser er i et sent stadium av den kliniske utviklingen for forskjellige stadier av kolorektalkreft. Kombinasjoner av flere av disse forbindelsene øker antallet potensielle behandlingstilbud som kan forventes for fremtiden. De aller fleste stoffene er i fase 2, der EGFR adresseres av disse forbindelsene oftere enn ved noe annet legemiddel under utvikling av kolorektalkreft, noe som skyldes det faktum at EGFR-uttrykkningen oppreguleres hos ~ 80 % av pasientene.

Kliniske forsøk med pasienter på stadium II som kombinerer kjemoterapi med de nylig godkjente monoklonale antistoffene (mAb-er) (cetuximab + irinotekan eller FOLFOX4, bevacizumab som et enkeltmiddel eller sammen med FOLFOX4) er nå gjennomført. Det ventes tre til fire års observasjonsperioder for statistisk signifikante resultater fra disse forsøkene.

Monoklonale antistoffer (mAb-er) som i dag anvendes i onkologi har generelt en utmerket sjanse for ikke å forstyrre aktiv immunterapi. Det er faktisk prekliniske bevis som tyder på at utarming av VEGF (av bevacizumab) bidrar positivt til DC-formidlet aktivering av T-celler.

Prostatakarsinom og andre tumorer

Med anslagsvis 27 050 dødsfall i 2007, er prostatakreft en ledende årsak til kreftdødsfall hos menn. Selv om dødeligheten har gått ned blant hvite og afroamerikanske menn siden begynnelsen av 1990-tallet, er dødeligheten blant afroamerikanske menn mer enn dobbelt så høy som hos hvite menn.

Prostatakreft er den hyppigste diagnostiserte kreftformen hos menn. Av grunner som forblir uklare, er insidensratene betydelig høyere hos afroamerikanske menn enn hos hvite menn. Insidensratene av prostatakreft har endret seg vesentlig i løpet av de siste 20 årene: de har hatt en rask økning fra 1988-1992, falt kraftig fra 1992-1995 og økt beskjedent siden 1995. Disse trendene reflekterer i stor grad økt screening med prostata for prostatakreft med den prostataspesifikke (PSA) antigenblodprøven. De moderate insidensrateøkningene det siste tiåret skyldes mest sannsynlig utbredt PSA-screening blant menn under 65 år. Prostatakreftinsidensratene har flatet ut hos menn i alderen 65 år og oppover. Ratene toppet seg hos hvite menn i 1992 (237,6 per 100 000 menn) og hos afroamerikanske menn i 1993 (342,8 per 100 000 menn).

Behandling av prostatakreft kan innebære årvåken venting, kirurgi, strålebehandling, høyintensitetsfokusert ultralyd (HIFU), kjemoterapi, kryokirurgi, hormonterapi, eller en kombinasjon. Hvilket alternativ som er best avhenger av sykdomsstadiet, Gleason-poengsummen, og PSA-nivået. Andre viktige faktorer er mannens alder, hans generelle helse, og hans følelser om mulige behandlinger og deres mulige bivirkninger. Ettersom alle behandlingene kan ha betydelige bivirkninger, så som erektil dysfunksjon og urininkontinens, har behandlingsdiskusjonene ofte fokus på å balansere målene for behandlingen med risikoen for livsstilsendringene.

Hvis kreften har spredd seg utover prostata, endrer behandlingsalternativene seg vesentlig, så de fleste legene som behandler prostatakreft anvender en rekke nomogrammer for å forutsi sannsynligheten for proliferasjon. Behandling ved årvåken venting, HIFU, strålebehandling, kryokirurgi, og kirurgi tilbys generelt til menn hvis kreft forblir innenfor prostata. Hormonbehandling og kjemoterapi reserveres ofte for sykdom som har spredd seg utover prostata. Det finnes imidlertid unntak: strålebehandling kan anvendes for noen avanserte tumorer, og hormonbehandling anvendes på noen tidlige stadium av tumorer. Det kan også tilbys kryoterapi, hormonbehandling og kjemoterapi hvis den innledende behandlingen mislykkes og kreften videreutvikler seg.

Hos et betydelig antall pasienter med prostatakreft som gjennomgår radikal prostataektomi på grunn av mistanke om klinisk organbegrenset vekst, viser en definitiv histologisk opparbeiding av den kirurgiske fremstillingen en lokalt omfattende tumor som strekker seg utenfor grensene av organet. Disse

pasientene har en høy risiko for tidlig lokalt tilbakefall, vanligvis detekterbart som et økende PSA-nivå i form av et biokjemisk tilbakefall. De terapeutiske mulighetene i denne situasjonen inkluderer ekstern strålebehandling og hormonbehandling; men verdien av disse terapeutiske tilnærmingene, spesielt med hensyn til å forlenge pasientens langsiktig overlevelse, må ikke betraktes som bevist. I tillegg må man vurdere mulige behandlingsforbundne komplikasjoner som for eksempel utviklingen av urinrørstrikturer (strålebehandling), tap av libido og impotens, risikoen for en reduksjon i skjelettkalsiumsalter i form av osteoporose, og en betydelig økt risiko for patologiske benbrudd (hormon ablasjon).

Mer enn 90 % av alle prostatakreftformer oppdages i de lokale og regionale stadiene; den 5-års relative overlevelseshraten for pasienter hvis tumorer er diagnostisert ved disse stadiene nærmer seg 100 %. I løpet av de siste 25 årene har 5-års overlevelseshraten for alle de kombinerte stadiene økt fra 69 % til nesten 90 %. Ifølge de nyeste dataene er relativ 10-års overlevelse 93 % og 15-års overlevelse er 77 %. De dramatiske forbedringene i overlevelse, spesielt etter 5 år, skyldes delvis tidligere diagnose og forbedringer i behandlingen. Ikke desto mindre synker overlevelseshraten vesentlig etter proliferasjon til andre vev og organer.

Lungekreft

Det forventes 210 000 nye tilfeller i 2007 i USA, dette utgjør ca. 15 % av kreftdiagnosene. Insidensraten avtar betydelig hos menn, fra en topp på 102 tilfeller per 100 000 i 1984 til 78,5 i 2003. Hos kvinner nærmer raten seg et platå etter en lang periode med økning. Lungekreft klassifiseres klinisk som småcellet (13 %) eller ikke-småcellet (87 %) for behandlingsformål.

Lungekreft utgjør de fleste kreftrelaterte dødsfallene hos både menn og kvinner. Det forventes at anslagsvis 160 390 dødsfall, som utgjør ca. 29 % av alle kreftdødsfallene, forekommer i 2007. Siden 1987 har det hvert år dødd flere kvinner av lungekreft enn av brystkreft. Dødelighetsratene har fortsatt å falle betydelig hos menn fra 1991-2003 med ca. 1,9 % per år. Kvinnelige lungekreftdødsrater nærmer seg et platå etter kontinuerlig økning i flere tiår. Disse trendene i lungekreftdødeligheten reflekterer nedgangen i røykeratene i løpet av de siste 30 årene.

Behandlingsalternativene bestemmes av typen (småcellet eller ikke-småcellet) og kreftstadiet og inkluderer kirurgi, strålebehandling, kjemoterapi, og målrettede biologiske behandlinger som bevacizumab (Avastin®) og erlotinib (Tarceva®). For lokaliserte kreftformer er kirurgi vanligvis

5 behandlingsalternativet. Nyere studier indikerer at overlevelse med ikke-småcellet lungekreft ved et tidlig stadium forbedres med kjemoterapi etter kirurgi. Fordi sykdommen vanligvis har spredd seg på det tidspunktet den oppdages, anvendes ofte strålebehandling og kjemoterapi, noen ganger i kombinasjon med kirurgi. Kjemoterapi alene eller kombinert med stråling er

10 det vanlige behandlingsalternativet for småcellet lungekreft; på dette regimet opplever en stor andel av pasientene remisjon, som er langvarig i noen tilfeller.

Den 1-års relative overlevelsen for lungekreft har økt fra 37 % i 1975-1979 til 42 % i 2002, i stor grad som følge av forbedringer av kirurgiske fremgangsmåter

15 og kombinerte behandlinger. Imidlertid er 5-års overlevelsesraten for alle de kombinerte stadiene bare 16 %. Overlevelsesraten er 49 % for tilfeller som oppdages når sykdommen fortsatt er lokalisert; imidlertid diagnostiseres bare 16 % av lungekrefttilfellene på dette tidlige stadiet.

20 Tabell 1: Anslåtte nye krefttilfeller og dødsfall etter kjønn i USA i 2007 (American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007.)

Seter	Anslåtte nye tilfeller			Anslåtte dødsfall		
	Begge kjønn	Menn	Kvinner	Begge kjønn	Menn	Kvinner
Gliom og hjerne	20 500	11 170	9 330	12 740	7 150	5 590
Bryst	180 510	2 030	178 480	40 910	450	40 460
Prostata	218 890	218 890		27 050	27 050	
Spiserør	15 560	12 130	3 430	13 940	10 900	3 040
Tykkertarmen	112 340	55 290	57 050	52 180	26 000	26 180
Nyre	51 190	31 590	19 600	12 890	8 080	4 810
Bukspyttkjertel	37 170	18 830	18 340	33 370	16 840	16 530

Seter	Anslåtte nye tilfeller			Anslåtte dødsfall		
	Begge kjønn	Menn	Kvinner	Begge kjønn	Menn	Kvinner
Plateepitelkarsinomer; Keratinolytiske neoplasmer i huden	1 000 000	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Leukemi	44 240	24 800	19 440	21 790	12 320	9 470
Lunge	213 380	114 760	98 620	160 390	89 510	70 880
Ikke-Hodgkins lymfom	63 190	34 210	28 990	18 660	9 600	9 060
Eggstokk	22 430		22 430	15 280		15 280
Melanom	59 940	33 910	26 030	8 110	5 220	2 890

WO 02/074237 beskriver fullengdeproteinet til SEQ ID No. 2 (FABP7), men ingen T-celleresponser mot proteinet er offentliggjort.

- 5 Det gjenstår dermed et behov for et nytt effektivt og sikkert behandlingsalternativ for glioblastom, prostatatumor, brystkreft, spiserørskreft, kolorektalkreft, klarcellet nyrecellekarsinom, lungekreft, kreft i sentralnervesystemet, eggstokkreft, føflekkreft (Tamm et al. 1998) kreft i bukspyttkjertelen, plateepitelkarsinom, leukemi og medulloblastom og andre tumorer som viser en overuttrykking av
- 10 survivin, styrker trivselen for pasientene uten å anvende kjemoterapeutika eller andre midler som kan føre til alvorlige bivirkninger.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- 15 Som anvendt i dette dokumentet, og bortsett fra det som er angitt, er alle uttrykkene definert som angitt nedenfor. Uttrykket «peptid» anvendes i dette dokumentet for å betegne en serie av aminosyrerester, som vanligvis er forbundet til hverandre ved hjelp av peptidbindinger mellom alfa-amino- og karbonylgruppene av de tilstøtende aminosyrene. Peptidene er fortrinnsvis 9
- 20 aminosyrer i lengde, men kan være så korte som 8 aminosyrer i lengde, og så lange som 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 eller 18 aminosyrer i lengde.

Uttrykket «oligopeptid» anvendes i dette dokumentet for å betegne en serie av aminosyrerester, som vanligvis er forbundet til hverandre ved hjelp av peptidbindinger mellom alfa-amino- og karbonylgruppene av de tilstøtende aminosyrene. Lengden på oligopeptidet er ikke kritisk for oppfinnelsen, så lenge den beholder den riktige epitopen/de riktige epitopene deri. Oligopeptidene er vanligvis mindre enn ca. 30 aminosyrerester i lengde, og større enn ca. 14 aminosyrer i lengde.

Uttrykket «polypeptid» angir en serie av aminosyrerester, vanligvis forbundet med hverandre ved hjelp av peptidbindinger mellom alfa-amino- og karbonylgruppene til de tilstøtende aminosyrene. Lengden på polypeptidet er ikke kritisk for oppfinnelsen så lenge de riktige epitopene opprettholdes. I motsetning til uttrykkene peptid eller oligopeptid er uttrykket polypeptid ment å referere til molekyler som inneholder mer enn ca. 30 aminosyrerester.

Et peptid, oligopeptid, protein eller polynukleotid som koder for et slikt molekyl er «immunogent» (og dermed et «immunogen» i den foreliggende oppfinnelsen), hvis det er i stand til å indusere en immunrespons. I tilfellet av den foreliggende oppfinnelsen er immunogenisitet mer spesifikt definert som evnen til å indusere en T-cellerespons. Dermed vil et «immunogen» være et molekyl som er i stand til å indusere en immunrespons, og i tilfellet av den foreliggende oppfinnelsen, et molekyl som er i stand til å indusere en T-cellerespons.

En T-celle-«epitop» krever et kort peptid som er bundet til en MHC-reseptor av klasse I eller II, og danner et ternært kompleks (alfakjede av MHC-klasse I, beta-2-mikroglobulin og peptid) som kan gjenkjennes av en T-celle som bærer en tilsvarende T-cellereseptorbinding til MHC/peptidkomplekset med passende affinitet. Peptider som binder til molekylerne av MHC-klasse I er vanligvis 8-14 aminosyrer i lengde, og mest typisk 9 aminosyrer i lengde. T-celleepitoper som binder til MHC-klasse II-molekyler er typisk 12 til 30 aminosyrer i lengde. I tilfelle av peptider som binder til molekyler av MHC-klasse II, kan det samme peptidet og den tilsvarende T-celleepitopen ha et felles kjernesegment, men skiller seg i den totale lengden på grunn av flankerende sekvenser av henholdsvis varierende lengder oppstrøms for aminoenden av kjernesekvensen og nedstrøms for karboksyenden. Reseptorene av MHC-klasse II har en mer åpen konformasjon, peptider bundet til reseptorene av MHC-klasse II er tilsvarende ikke fullstendig nedgravd i strukturen av molekylpeptidbindingskløften av MHC-klasse II. Overraskende nok er dette ikke

tilfellet for peptidet ifølge SEQ ID NO: 1, ettersom små variasjoner i lengden av peptidet gir en ekstrem reduksjon av aktiviteten (se nedenfor).

5 Hos mennesker er det tre forskjellige genetiske lokuser som koder for molekyler av MHC-klasse I (MHC-molekylene til mennesket er også betegnet humane leukocyttantigener (HLA)): HLA-A, HLA-B og HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 og HLA-A*11 er eksempler på forskjellige alleler av MHC-klasse I som kan uttrykkes fra disse lokusene.

10 Det er tre forskjellige lokuser i det humane genomet for genene av MHC-klasse II: HLA-DR, HLA-DQ og HLA-DP. Reseptorer av MHC-klasse II er heterodimerer som består av en alfa- og en betakjede, begge er forankret i cellemembranen via et transmembranområde. HLA-DRB1*04 og HLA-DRB1*07 er to eksempler på forskjellige betaalleler av MHC-klasse II som er kjent for å kodes i disse
15 lokusene. Alleler av klasse-II er svært polymorfe, det er f.eks. beskrevet flere hundre forskjellige HLA-DRB1-alleler. For HLA-A*02 og de hyppigste HLA-DR-serotypene er uttrykingsfrekvenser i ulike populasjoner vist i tabell 2.

20 Tabell 2: Uttrykingsfrekvensene F av HLA*A02 og de hyppigste HLA-DR-serotypene. Frekvensene utledes fra haplotypefrekvenser G_f i den amerikanske populasjonen tilpasset fra Mori et al. (Mori et al., 1997) som benytter Hardy-Weinberg-formelen $F=1-(1-G_f)^2$. Kombinasjoner av A*02 med visse HLA-DR-alleler kan være beriket eller mindre hyppig enn forventet fra sine enkle frekvenser som følge av koblingsulikevekt. For detaljer se Chanock et al. (Chanock et al., 2004).

Uttrykingsfrekvenser av HLA*02- og HLA-DR-serotyper hos nordamerikanske underpopulasjoner				
HLA-allel	Kaukasisk-amerikansk	Afroamerikansk	Asiatisk-amerikansk	Latinamerikansk
A*02	49,1 %	34,1 %	43,2 %	48,3 %
DR1	19,4 %	13,2 %	6,8 %	15,3 %
DR2	28,2 %	29,8 %	33,8 %	21,2 %
DR3	20,6 %	24,8 %	9,2 %	15,2 %
DR4	30,7 %	11,1 %	28,6 %	36,8 %
DR5	23,3 %	31,1 %	30,0 %	20,0 %

	Uttrykingsfrekvenser av HLA*02- og HLA-DR-serotyper hos nordamerikanske underpopulasjoner			
HLA-allel	Kaukasisk-amerikansk	Afroamerikansk	Asiatisk-amerikansk	Latinamerikansk
DR6	26,7 %	33,7 %	25,1 %	31,1 %
DR7	24,8 %	19,2 %	13,4 %	20,2 %
DR8	5,7 %	12,1 %	12,7 %	18,6 %
DR9	2,1 %	5,8 %	18,6 %	2,1 %

Derfor, for terapeutiske og diagnostiske formål er et peptid som binder med passende affinitet til flere forskjellige reseptorer av HLA-klasse II meget ønskelig. En peptidbinding til flere forskjellige molekyler av HLA-klasse II kalles en promiskuøs binder.

Som anvendt i dette dokumentet inkluderes en henvisning til en DNA-sekvens som både enkelttrådet og dobbelttrådet DNA. Dermed henviser den spesifikke sekvensen, med mindre sammenhengen indikerer noe annet, til det enkelttrådede DNA-et fra en slik sekvens, duplekse av en slik sekvens med sitt komplement (dobbelttrådet DNA) og komplementet av en slik sekvens. Uttrykket «kodende område» refererer til den delen av et gen som enten naturlig eller normalt koder for uttrykingsproduktet av genet i sitt naturlige genommiljø, dvs. området kodende in vivo for det opprinnelige uttrykingsproduktet av genet.

Det kodende området kan være fra et normalt, mutert eller endret gen, eller kan også være fra en DNA-sekvens eller gen, helt syntetisert i laboratoriet ved hjelp av fremgangsmåter som er godt kjent for fagfolk på området for DNA-syntese.

Uttrykket «nukleotidsekvens» refererer til en heteropolymer av deoksyribonukleotider.

Nukleotidsekvensen som koder for et bestemt peptid, oligopeptid eller polypeptid kan være naturlig forekommende, eller de kan konstrueres syntetisk. Generelt settes DNA-segmenter som koder for peptidene, polypeptidene og proteinene ifølge denne oppfinnelsen sammen av cDNA-fragmenter og korte oligonukleotidlinkere, eller fra en serie av oligonukleotider, for å tilveiebringe et syntetisk gen som er i

stand til å uttrykkes i en rekombinant transkripsjonsenhet omfattende regulerende elementer som stammer fra en mikrobiell eller viral operon.

5 Uttrykket «uttrykkingsprodukt» betyr polypeptidet eller proteinet som er det naturlige translasjonsprodukt av genet, og hvilken som helst nukleinsyresekvens som koder for ekvivalenter som skyldes genetisk kodedegenerasjon og dermed koder for de(n) samme aminosyren(e).

10 Uttrykket «fragment», når det refereres til en kodende sekvens, betyr en del av DNA omfattende mindre enn det fullstendige kodende området, hvis uttrykkingsprodukt beholder i det vesentlige den samme biologiske funksjonen eller aktiviteten som uttrykkingsproduktet av det fullstendige kodende området.

15 Uttrykket «DNA-segment» henviser til en DNA-polymer, i form av et separat fragment eller som en komponent av en større DNA-konstruksjon, som er blitt avledet fra DNA isolert minst én gang i vesentlig ren form, dvs. fri for forurensende endogene materialer og i en mengde eller konsentrasjon som muliggjør identifisering, manipulering og gjenvinning av segmentet og dens komponentnukleotidsekvenser ved standard biokjemiske fremgangsmåter, for eksempel ved hjelp av en kloningsvektor. Slike segmenter tilveiebringes i formen av 20 en åpen leseramme uavbrutt av indre ikke-translaterte sekvenser, eller introner, som vanligvis er til stede i eukaryote gener. Sekvenser av ikke-translatert DNA kan være til stede nedstrøms for den åpne leserammen, der de samme ikke kommer i konflikt med manipulasjon eller uttrykking av de kodende områdene.

25 Uttrykket «primer» betyr en kort nukleinsyresekvens som kan sammenkobles med en tråd av DNA og tilveiebringer en fri 3'OH-ende der en DNA-polymerase starter syntesen av en deoksyribonukleotidkjede.

30 Uttrykket «promotor» betyr et område av DNA som er involvert i bindingen av RNA-polymerase for å initiere transkripsjon.

35 Uttrykket «åpen leseramme (ORF)» betyr en serie av tripletter som koder for aminosyrer uten termineringskodoner og er en sekvens (potensielt) translaterbar i protein.

Uttrykket «isolert» betyr at materialet fjernes fra sitt opprinnelige miljø (f.eks. det naturlige miljøet hvis det er naturlig forekommende). For eksempel isoleres ikke et naturlig forekommende polynukleotid eller polypeptid som er til stede i et levende dyr, men det samme polynukleotidet eller polypeptidet separert fra noe av eller alle de sameksisterende materialene i det naturlige systemet, isoleres. Slike polynukleotider kan være en del av en vektor og/eller slike polynukleotider eller polypeptider kan være en del av en sammensetning, og isoleres fortsatt ved at en slik vektor eller sammensetning ikke er en del av dets naturlige miljø.

Polynukleotidene, og rekombinante eller immunogene polypeptider, offentliggjort i samsvar med den foreliggende oppfinnelsen kan også være i «renset» form. Uttrykket «renset» krever ikke absolutt renhet; snarere er det ment som en relativ definisjon, og kan inkludere preparater som er høyt renset eller preparater som bare er delvis renset, siden disse uttrykkene forstås av fagfolk i den relevante teknikken. For eksempel har individuelle kloner isolert fra et cDNA-bibliotek konvensjonelt blitt renset til elektroforetisk homogenitet. Rensing av utgangsmateriale eller naturlig materiale til minst en størrelsesorden, fortrinnsvis to eller tre størrelsesordener, og mer foretrukket fire eller fem størrelsesordener, er uttrykkelig omfattet. Videre er polypeptidet som er omfattet av kravene og som har en renhet på fortrinnsvis 99,999 %, eller minst 99,99 % eller 99,9 %; og til og med ønskelig 99 vekt-% eller større, uttrykkelig omfattet.

Nukleinsyrene og polypeptiduttrykkingsproduktene offentliggjort ifølge den foreliggende oppfinnelsen, så vel som uttrykkingsvektorer som inneholder slike nukleinsyrer og/eller slike polypeptider, kan være i «anrikt form». Som anvendt i dette dokumentet betyr uttrykket «anrikt» at konsentrasjonen av materialet er minst ca. 2, 5, 10, 100 eller 1000 ganger sin naturlige konsentrasjon (for eksempel), fordelaktig 0,01 vekt-%, fortrinnsvis minst ca. 0,1 vekt-%. Anrikede preparater på ca. 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % og 20 vekt-% er også omfattet. Sekvensene, konstruksjonene, vektorene, klonene, og andre materialer omfattende den foreliggende oppfinnelsen kan med fordel være i anrikt eller isolert form.

Uttrykket «aktivt fragment» betyr et fragment som genererer en immunrespons (dvs. har immunogen aktivitet) når det administreres alene eller eventuelt sammen med en egnet adjuvans, til et dyr, så som et pattedyr, for eksempel, en kanin eller mus, og også inkludert et menneske, en slik immunrespons tar form av å stimulere

en T-cellerespons i mottakerdyret, så som et menneske. Alternativt kan det «aktive fragmentet» også anvendes til å indusere en T-cellerespons in vitro.

Som anvendt i dette dokumentet refererer uttrykkene «del», «segment» og «fragment», når de anvendes i forbindelse med polypeptider, til en kontinuerlig sekvens av rester, så som aminosyrerester, der sekvensen danner en undergruppe av en større sekvens. Dersom for eksempel et polypeptid ble utsatt for behandling med hvilken som helst av de vanlige endopeptidasene, så som trypsin eller kymotrypsin, ville oligopeptidene som følge av slik behandling, representere deler, segmenter eller fragmenter av utgangspolypeptidet. Dette betyr at ethvert slikt fragment, som en del av sin aminosyresekvens, nødvendigvis vil inneholde et segment, fragment eller en del, som er i det vesentlige identisk, om ikke helt identisk, med en sekvens med SEQ ID NO: 1 til 12, som svarer til de naturlig forekommende proteinene, eller «moder»-proteinene med SEQ ID NO: 1 til 12. Når de anvendes i forbindelse med polynukleotider refererer slike uttrykk til produktene som produseres ved behandling av polynukleotidene med hvilken som helst av de vanlige endonukleasene.

I samsvar med den foreliggende oppfinnelsen betyr begrepet «prosent identitet» eller «prosent identisk» når det refererer til en sekvens, at en sekvens sammenlignes med sekvens som er omfattet av kravene eller en beskrevet sekvens etter sammenstilling av sekvensen som skal sammenlignes (den «sammenlignede sekvensen») med sekvensen som er omfattet av kravene eller den beskrevne sekvensen («referansesekvensen»). Prosent identitet bestemmes deretter ifølge den følgende formelen:

$$\text{Prosent identitet} = 100 [I - (C/R)]$$

der C er antallet forskjeller mellom referansesekvensen, og den sammenlignede sekvensen over lengden av sammenstillingen mellom referansesekvens og den sammenlignede sekvensen, der

(i) hver base eller aminosyre i referansesekvens som ikke har en tilsvarende, sammenstilt base eller aminosyre i den sammenlignede sekvensen og

(ii) hver åpning i referansesekvensen og

(iii) hver sammenstilte base eller aminosyre i den sammenlignede sekvensen som er forskjellig fra en sammenstilt base eller aminosyre i de sammenlignede sekvensen, utgjør en forskjell;

og R er antallet baser eller aminosyrer i referansesekvensen over lengden av sammenstillingen med den sammenlignede sekvensen der hvilken som helst åpning dannet i referansesekvensen også regnes som en base eller aminosyre.

- 5 Hvis det eksisterer en sammenstilling mellom den sammenlignede sekvensen og referansesekvensen der den prosentvise identiteten som beregnet ovenfor er ca. lik eller større enn en spesifisert minimumsprosentidentitet, har den sammenlignede sekvensen den spesifiserte minimumsprosentidentiteten til referansesekvensen selv om det kan eksistere sammenstillinger der den
- 10 ovennevnte beregnede prosentidentiteten i dette dokumentet er mindre enn den spesifiserte prosentidentiteten.

De originale peptidene offentliggjort i dette dokumentet kan modifiseres ved substitusjonen av en eller flere rester i forskjellige, eventuelt selektive, seter innen

15 peptidkjeden, om ikke annet er angitt. Slike substitusjoner kan være av en konservativ natur, for eksempel der en aminosyre erstattes med en aminosyre med lignende struktur og egenskaper, så som der en hydrofob aminosyre erstattes med en annen hydrofob aminosyre. Enda mer konservativt ville være erstatning av aminosyrer av samme eller lignende størrelse og kjemisk art, som for eksempel der

20 leucin erstattes med isoleucin. I studier av sekvensvariasjoner i familier av naturlig forekommende homologe proteiner, er visse aminosyresubstitusjoner oftere tolerert enn andre, og disse viser ofte korrelasjon med likheter i størrelse, ladning, polaritet og hydrofobisitet mellom den originale aminosyren og dens erstatning, og slik er grunnlaget for å definere «konservative erstatninger.»

25 Konservative erstatninger defineres i dette dokumentet som utvekslinger innenfor én av de følgende fem gruppene: Gruppe 1-små alifatiske, polare eller litt polare rester (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Gruppe 2-polare, negativt ladede rester og deres amider (Asp, Asn, Glu, Gin); Gruppe 3-polare, positivt ladede

30 rester (His, Arg, Lys); Gruppe 4-store, alifatiske, ikke-polare rester (Met, Leu, Ile, Val, Cys); og Gruppe 5-store, aromatiske rester (Phe, Tyr, Trp).

Mindre konservative erstatninger kan involvere erstatning av en aminosyre med en annen som har lignende egenskaper, men er noe forskjellig i størrelse, som

35 for eksempel erstatning av en alanin- med en isoleucinrest. Sterkt ikke-konservative erstatninger kan innebære erstatning av en sur aminosyre med en som er polar, eller selv for en som er basisk. Slike «radikale» erstatninger kan

imidlertid ikke avvises som potensielt ineffektive ettersom kjemiske påvirkninger ikke er helt forutsigbare og radikale erstatninger kan også gi opphav til tilfeldige effekter som ellers ikke forutsies ut fra enkle kjemiske prinsipper.

- 5 Selvsagt kan slike erstatninger involvere andre strukturer enn de vanlige L-aminosyrene. Dermed kan D-aminosyrer erstattes med L-aminosyrene som vanligvis finnes i de antigene peptidene ifølge oppfinnelsen og likevel omfattes av offentliggjøringen i dette dokumentet. I tillegg kan aminosyrene som innehar ikke-standard R-grupper (dvs. andre R-grupper enn de som finnes i de
- 10 20 vanlige aminosyrene av naturlige proteiner) også anvendes for erstatningsformål for å frembringe immunogener og immunogene polypeptider ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

- 15 Hvis erstatningene ved mer enn én posisjon viser seg å føre til et peptid med i det vesentlige tilsvarende eller større antigenisk aktivitet, som definert nedenfor, vil kombinasjoner av disse erstatningene testes for å bestemme om de kombinerte erstatningene gir additive eller synergistiske effekter på antigenisiteten av peptidet. På det meste vil ikke mer enn 4 posisjoner i peptidet erstattes samtidig.

- 20 Uttrykket «T-cellerespons» betyr den spesifikke proliferasjonen og aktiveringen av effektorfunksjoner induert av et peptid in vitro eller in vivo. For begrensede CTL-er av MHC-klasse I kan effektorfunksjoner være lysering av peptidpulsede, peptidforløperpulsede eller naturlige peptidpresenterende målceller, utskillelse av cytokiner, fortrinnsvis Interferon-gamma, TNF- α eller IL-2-indusert av
- 25 peptid, utskillelse av effektormolekyler, fortrinnsvis granzymmer eller perforiner induert av peptid eller degranulering. For begrensede T-hjelperceller av MHC-klasse I, kan effektorfunksjoner være peptidindusert utskillelse av cytokiner, fortrinnsvis IFN-gamma, TNF- α , IL-4, IL5, IL-10 eller IL-2, eller peptidindusert degranulering. Mulige effektorfunksjoner for CTL-er og T-
- 30 hjelperceller er ikke begrenset til denne listen.

Immunterapeutiske behandlingstilnærminger

- 35 Stimulering av en immunrespons avhenger av nærvær av antigener gjenkjent som fremmede av vertsimmunsystemet. Oppdagelsen av eksistensen av tumorassosierte antigener har nå hevet muligheten for å anvende et vertsimmunsystem til å gripe

inn i tumorveksten. Forskjellige mekanismer for å utnytte både de humorale og cellulære armene av immunsystemet undersøkes for tiden for kreftimmunoterapi.

Spesifikke elementer av den cellulære immunresponsen er i stand til spesifikt å gjenkjenne og ødelegge tumorceller. Isoleringen av cytotoksiske T-celler (CTL) av tumor-infiltrerende cellepopulasjoner eller fra perifert blod tyder på at slike celler spiller en viktig rolle i naturlige immunforsvar mot kreft (Cheever et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1993 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; *J Immunol.* 1999, 162(2):989-94; CTL-er med høy aviditet for to selvantigener demonstrerer overlegen in vitro- og in vivo-antitumoreffekt.). CD8-positive T-celler i særdeleshet, som gjenkjenner molekyler av klasse I av de hovedhistokompatibilitetskompleksholdige peptidene av vanligvis 8 til 10 rester avledet fra proteiner eller defekte ribosomale produkter (DRIPS) (Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR.; Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes; *Nature* 2000; 404(6779):770-774) lokalisert i cytosolene, spiller en viktig rolle i denne responsen. MHC-molekylene til mennesket betegnes også som humane leukocyttantigener (HLA).

Det er to klasser av MHC-molekyler: Molekyler av MHC-klasse I som man kan finne på de fleste cellene har en kjerne som presenterer peptider som følge av proteolytisk spalting av hovedsakelig endogene, cytosoliske eller kjerneproteiner, DRIPS og større peptider. Imidlertid finner man peptider avledet fra endosomale rom eller eksogene kilder også ofte på molekyler av MHC-klasse I. Denne ikke-klassiske veien for presentasjon av klasse I refereres til som tverrpresentasjon i litteraturen. Molekyler av MHC-klasse kan finnes hovedsakelig på profesjonelle antigenpresenterende celler (APC-er), og presenterer hovedsakelig peptider av eksogene proteiner som tas opp av APC-er i løpet av endocytoseforløpet, og behandles etterpå. Som for klasse I beskrives alternative veier for antigenprosessering som tillater peptider fra endogene kilder å presenteres av molekyler av MHC-klasse II (f.eks. autofagocytose). Komplekser av peptid og molekyler av MHC-klasse I gjenkjennes av CD8-positive cytotoksiske T-lymfocytter som bærer det hensiktsmessige TCR-et, komplekser av peptid og molekyler av MHC-klasse II som gjenkjennes av CD4-positive T-hjelperceller som bærer de hensiktsmessige TCR-ene.

CD4-positive T-hjelperceller spiller en viktig rolle i å dirigere effektorfunksjonene av anti-tumor-T-celleresponser og av denne grunn kan identifiseringen av CD4-positive T-celleepitoper avledet fra tumorassosierte antigener (TAA), være av stor viktighet for utviklingen av farmasøytiske produkter for å utløse anti-tumorimmunresponser (Kobayashi, H., R. Omiya, M. Ruiz, E. Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. Herraiz, B. Sangro, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta, and E. Celis. Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8:3219-3225., Gnjatich, S., D. Atanackovic, E. Jäger, M. Matsuo, A. Selvakumar, N.K. Altorki, R.G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y.T. Chen, A. Knuth, and L.J. Old. Survey of naturally occurring CD4+ T-cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100 (15): 8862-7) CD4+ T cells can lead to locally increased levels of IFN-gamma (Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T; A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells; *J Cancer Res*; 2003, 63(14): 4095-4100).

Det ble vist i pattedyrremodeller, f.eks. mus, at selv i fravær av CTL-effektorceller (dvs. CD8-positive T-lymfocytter), er CD4-positive T-celler tilstrekkelige til å hemme manifestasjon av tumorer via hemming av angiogenese ved utskillelse av interferon-gamma (IFN γ) (Qin, Z. and T. Blankenstein. CD4+ T-celleformidlet tumoravvisning involverer hemming av angiogenese som er avhengig av IFN-gammareseptoruttrykking av ikke-hematopoietiske celler. *Immunity.* 2000, 12:677-686). I tillegg ble det vist at CD4-positive T-celler som gjenkjenner peptider fra tumorassosierte antigener som presenteres av molekyler av HLA-klasse II kan motvirke tumorprogresjon via induksjonen av et antistoff (Ab) responser (Kennedy, R.C., M.H. Shearer, A.M. Watts, and R.K. Bright. CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res.* 2003, 63:1040-1045). I motsetning til tumorassosierte peptider som binder til molekyler av HLA-klasse I, har bare et lite antall av ligander av klasse II av TAA blitt beskrevet så langt (www.cancerimmunity.org, www.syfpeithi.de).

Ettersom den konstitutive uttrykkingen av molekyler av HLA-klasse II vanligvis begrenses til celler i immunsystemet (Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 1996, 14: 301-331), ble muligheten for å isolere peptider av

klasse II direkte fra primære tumorer ikke ansett mulig. Men oppfinnerne klarte nylig å identifisere en rekke epitoper av MHC-klasse II direkte fra tumorer (EP 1642905, EP 1760088; Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Müller M, Krämer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; Clin Cancer Res. 2006; 12:4163-4170).

I fravær av inflammasjon begrenses uttrykking av molekyler av MHC-klasse II i hovedsak til celler i immunsystemet, spesielt APC-er, f.eks. monocytter, monocyttaavledede celler, makrofager, dendrittceller. Hos tumorpasienter har celler av tumoren overraskende blitt funnet å uttrykke molekyler av MHC-klasse II (Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Müller M, Krämer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanović S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; Clin Cancer Res. 2006; 12:4163-4170)

For at et peptid skal kunne trigge (utløse) en cellulær immunrespons, må det binde til et MHC-molekyl. Denne prosessen er avhengig av allelet av MHC-molekylet og spesifikke polymorfismer av aminosyresekvensen av peptidet. MHC-klasse-I-bindende peptider er vanligvis 8-10 aminosyrerester i lengde og inneholder vanligvis to konserverte rester («anker») i deres sekvens som interagerer med det tilsvarende bindingssporet på MHC-molekylet. På denne måten har hver MHC-allel et «bindingsmotiv» som bestemmer hvilke peptider som kan binde spesifikt til bindingssporet (Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs, Landes Bioscience, USA, 1997).

I MHC-avhengig immunreaksjon må ikke peptider bare være i stand til å binde til visse MHC-molekyler som uttrykkes av tumorceller, de må også gjenkjennes av T-celler som bærer spesifikke T-cellerreseptorer (TCR).

Antigenene som gjenkjennes av tumorspesifikke T-lymfocytter, det vil si deres epitoper, kan være molekyler avledet fra alle proteinklasser, som for eksempel enzymer, reseptorer, transkripsjonsfaktorer osv. Videre kan tumorassosierte antigener for eksempel også være til stede i bare tumorceller, for eksempel som produkter av muterte gener. En annen viktig klasse av tumorassosierte

antigener er vevsspesifikke antigener, så som CT («testikkelkreft»)-antigener som uttrykkes i forskjellige typer tumorer og i friskt vev av testiklene.

5 Forskjellige tumorassosierte antigener er blitt identifisert. Videre er det utført en stor forskningsinnsats for å identifisere ytterligere tumorassosierte antigener. Noen grupper av tumorassosierte antigener, også referert til i teknikken som tumorspesifikke antigener, er vevsspesifikke. Eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til, tyrosinase for melanom, PSA og PSMA for prostatakreft og kromosomale cross-overs (translokasjoner) så som bcr/abl i lymfom. Men mange 10 identifiserte tumorassosierte antigener opptrer i flere tumortyper, og noen, så som onkogene proteiner og/eller tumorsuppressorgener (tumorsuppressorgener er for eksempel gjennomgått for nyrekreft i Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. J Urol. 2003 Des.; 170 (6Pt1): 2163-72) som faktisk forårsaker transformasjonshendelsen, oppstår i nesten alle 15 tumortyper. For eksempel kan normale cellulære proteiner som kontrollerer cellevekst og differensiering, så som p53 (som er et eksempel på et tumorsuppressorgen), ras, c-met, myc, pRB, VHL og HER-2/neu, akkumulere mutasjoner som fører til oppregulering av uttrykking av disse genproduktene og gjør dem derved onkogene (McCartey et al. Cancer Research, 1998, 15:58 2601-5; Disis et al. Ciba Found. Symp. 1994, 187:198-211). Disse mutante proteinene 20 kan også være et mål for en tumorspesifikk immunrespons i flere krefttyper.

Immunterapi hos kreftpasienter tar sikte på å aktivere cellene i immunsystemet spesifikt, spesielt de såkalte cytotoksiske T-cellene (CTL, også kjent som «dreperceller», også kjent som CD8-positive T-celler), mot tumorceller, men 25 ikke mot sunt vev. Tumorceller skiller seg fra friske celler ved uttrykkingen av tumorassosierte proteiner. HLA-molekyler på celleoverflaten presenterer det cellulære innholdet til utsiden, og gjør dermed at en cytotoksisk T-celle kan skille mellom en frisk celle og en tumorcelle. Dette realiseres ved å bryte ned alle 30 proteinene inne i cellen til korte peptider, som deretter festes til HLA-molekyler og presenteres på celleoverflaten (Rammensee et al., 1993). Peptider som presenteres på tumorceller, men ikke eller i langt mindre grad på friske celler i kroppen, kalles tumorassosierte peptider (TUMAP-er).

35 For proteiner som skal gjenkjennes av cytotoksiske T-lymfocytter som tumorspesifikke eller -assosierte antigener, og som skal anvendes i terapi, må særlige forutsetninger være oppfylt. Antigenet bør uttrykkes hovedsakelig av

tumorceller og ikke av normale, friske vev eller i sammenlignbare mindre mengder. Det er videre ønskelig at det respektive antigenet ikke bare er til stede i en tumortype, men også i høye konsentrasjoner (dvs. kopitall av det respektive peptidet pr celle). Tumorspesifikke og tumorassosierte antigener avledes ofte fra proteiner som er direkte involvert i transformasjonen av en normal celle til en tumorcelle på grunn av en funksjon, f.eks. i cellesykluskontroll eller apoptose. I tillegg kan også nedstrøms mål av proteinene som direkte utløser en transformasjon oppreguleres og dermed være indirekte tumorassosiert. Slike indirekte tumorassosierte antigener kan også være mål på en vaksinasjonstilnærming. Det vesentlige i begge tilfellene er nærværet av epitoper i aminosyresekvensen av antigenet, siden et slikt peptid («immunogent peptid») som avledes fra et tumorassosiert antigen bør føre til en in vitro- eller in vivo-T-cellerespons.

I utgangspunktet kan ethvert peptid i stand til å binde et MHC-molekyl fungere som en T-celleepitop. En forutsetning for å utløse en in vitro- eller in vivo-T-cellerespons er nærværet av en T-celle med en tilsvarende TCR og fraværet av toleranse for denne spesielle epitopen. T-hjelperceller spiller en viktig rolle i å dirigere effektorfunksjonen av CTL-er i antitumorimmunitet. T-hjelpercelleepitoper som trigger en T-hjelpercellerespons av TH1-typen støtter effektorfunksjoner av CD8-positive T-dreperceller, som inkluderer cytotoksiske funksjoner rettet mot tumorceller som viser tumorassosierte peptid/MHC-komplekser på deres celleoverflater. På denne måten kan tumorassosierte T-hjelpercellepeptidepitoper, alene eller i kombinasjon med andre tumorassosierte peptider, tjene som aktive farmasøytiske ingredienser til vaksinesammensetninger som stimulerer anti-tumorimmunresponser.

Siden begge responstypene, CD8- og CD4-avhengige, bidrar i fellesskap og synergistisk til anti-tumoreffekten, er identifiseringen og karakteriseringen av tumorassosierte antigener gjenkjent av enten CD8-positive CTL-er (molekylet av MHC-klasse I) eller CD4-positive CTL-er (molekylet av MHC-klasse II) viktig i utviklingen av tumorvaksiner. Det er derfor et formål med den foreliggende oppfinnelsen å tilveiebringe sammensetninger av peptider som inneholder peptider som bindes til MHC-komplekser av begge klassene.

De første kliniske studiene som anvendte tumorassosierte peptider begynte på midten av 1990-tallet av Boon og kolleger, hovedsakelig for indikasjonen føflekkreft. De kliniske responsene i de beste studiene varierte fra 10 til 30 %. Alvorlige

bivirkninger eller alvorlig autoimmunitet har ikke blitt rapportert i noen klinisk studie ved hjelp av peptidbasert vaksinemonoterapi. Milde former for vitiligo er rapportert for noen pasienter som hadde blitt behandlet med melanomassosierte peptider.

5 Men priming av en type CTL er vanligvis tilstrekkelig til å eliminere alle tumorcellene. Tumorer er veldig mutagene og dermed i stand til å reagere raskt på CTL-angrep ved å endre deres proteinmønster for å unngå gjenkjennelse av CTL-er. Det anvendes en rekke spesifikke peptider for vaksinasjonen for å motangripe de tumorunnavikende mekanismene. På denne måten kan det rettes
10 et bredt samtidig angrep mot tumoren av flere CTL-kloner samtidig. Dette kan redusere tumorens sjanser til å unngå immunresponsen. Denne hypotesen har nylig blitt bekreftet i en klinisk studie som behandler føflekkreftpasienter ved et sent stadium. Med bare noen få unntak viste pasienter som hadde minst tre forskjellige T-celleresponser objektiv klinisk respons eller stabil sykdom
15 (Banchereau et al., 2001) så vel som økt overlevelse (personlig kommunikasjon med J. Banchereau), mens det store flertallet av pasienter med mindre enn tre T-celleresponser ble diagnostisert med progressiv sykdom.

20 En studie av søkerne viste en tilsvarende effekt når pasienter som lider av nyrecellekarsinom ble behandlet med en vaksine sammensatt av 13 forskjellige peptider (H. Singh-Jasuja, S. Walter, T. Weinschenk, A. Mayer, P. Y. Dietrich, M. Staehler, A. Stenzl, S. Stevanovic, H. Rammensee, J. Frisch; Correlation of T-cell response, clinical activity and regulatory T-cell levels in renal cell carcinoma patients treated with IMA901, a novel multi-peptide vaccine; ASCO Meeting 2007 Poster # 3017; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, ASCO meeting 2007; Poster # 3017).

30 Hovedoppgaven i utviklingen av en tumorvaksine er derfor ikke bare identifisering og karakteriseringen av nye tumorassosierte antigener og immunogene T-hjelperepitoper avledet av disse, men også kombinasjonen av forskjellige epitoper for å øke sannsynligheten for en respons på mer enn en epitop for hver pasient. Det er derfor et formål med den foreliggende oppfinnelsen å tilveiebringe kombinasjoner
35 av aminosyresekvenser av slike peptider som har evnen til å binde til et molekyl av det humane hovedhistokompatibilitetskomplekset (MHC) av klasse I (HLA-klasse I).

Det er et ytterligere formål med den foreliggende oppfinnelsen å tilveiebringe en effektiv anti-kreftvaksine som er basert på en kombinasjon av peptidene.

5 I den foreliggende oppfinnelsen isolerte og karakteriserte oppfinnerne peptidene som binder til molekyler av HLA-klasse I eller II direkte fra pattedyrtumorer, dvs. primære prøver av hovedsakelig pasienter med glioblastom, men også fra primære vevsprøver av kolorektalkreft, nyrecellekarsinom, lungekreft, bukspyttkjertelkreft, malignt melanom og kreft i magesekken.

10 Det er beskrevet peptider som stammer fra antigener forbundet med tumorigenese, og som har evnen til å binde tilstrekkelig til molekyler av MHC (HLA) klasse-II for å trigge en immunrespons av humane leukocytter, særlig lymfocytter, særlig T-lymfocytter, særlig CD4-positive T-lymfocytter, særlig CD4-positive T-lymfocytter som formidler immunresponsen av T_{H1} -type.

15 Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer peptider som stammer fra antigener forbundet med tumorigenese, og har evnen til å binde tilstrekkelig til molekyler av MHC (HLA) klasse-I for å trigge en immunrespons av humane leukocytter, særlig lymfocytter, særlig T-lymfocytter, særlig CD8-positive cytotoksiske T-lymfocytter, samt kombinasjoner av de to som er spesielt nyttige for vaksinerings pasienter som lider av kreft.

25 Ifølge den foreliggende oppfinnelsen løses formålet ved å tilveiebringe en farmasøytisk sammensetning omfattende et peptid som består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO 2, og et peptid som består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO 3, og en farmasøytisk akseptabel bærer. De farmasøytiske sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan også videre omfatte minst ett ytterligere peptid som består av en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO 1, og SEQ ID NO 30 4 til SEQ ID NO 12. Peptidene kan også ha ikke-peptidbindinger.

Som beskrevet nedenfor i dette dokumentet har peptidene med unntak av MET-005 som danner grunnlaget for den foreliggende oppfinnelsen alle blitt identifisert som presentert av bærende celler av MHC-klasse. Dermed utløser 35 disse bestemte peptidene samt andre peptider som inneholder sekvensen (dvs. avledede peptider) alle en spesifikk T-cellerespons, men i hvilken grad en slik reaksjon vil bli induisert kan variere fra det enkelte peptidet og den enkelte

pasienten. Forskjeller kan forårsakes av for eksempel mutasjoner i peptidene. Personen med kunnskap innenfor den foreliggende teknikken er godt kjent med fremgangsmåter som kan brukes til å bestemme i hvilken grad en reaksjon induseres av det enkelte peptidet, spesielt med henvisning til eksemplene i dette dokumentet og den respektive litteraturen.

Peptidene stammer fra tumorassosierte antigener, spesielt tumorassosierte antigener med funksjoner i f.eks. proteolyse, angiogenese, cellevekst, cellesyklusregulering, celledeling, regulering av transkripsjon, regulering av translasjon, vevsinvasjon osv. Tabell 3 tilveiebringer peptidene og funksjonen av proteinet peptidene avledes fra.

Tabell 3: Peptider (2 og 3 er ifølge den foreliggende oppfinnelsen) og funksjonen til moderproteinet

SEQ ID NO	Peptid-ID	Sekvens	Gensymbol	Funksjon	binder til MHC
1	CSP-001	TMLARLASA	CSPG4	Transmembranproteoglykan involvert i neovaskularisering	HLA-A*02
2	FABP7-001	LTFGDVVAV	FABP7	Sentralnervesystemspesifikt fettsyrebindingsprotein	HLA-A*02
3	NLGN4X-001	NLDTLMTYV	NLGN4X	Celleadhesjonsmolekyl	HLA-A*02
4	TNC-001	AMTQLLAGV	TNC	Ekstracellulært matriksprotein	HLA-A*02
5	NRCAM-001	GLWHHQTEV	NRCAM	Nevronalt celleadhesjonsmolekyl	HLA-A*02
6	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3	mRNA-bindingsprotein	HLA-A*02
7	BCA-002	ALWAWPSEL	BCAN	Proteoglykan	HLA-A*02

SEQ ID NO	Peptid-ID	Sekvens	Gensymbol	Funksjon	binder til MHC
8	MET-005	TFSYVDPVI TSISPKYG	MET	Vekstfaktorreseptor	Lang-strakt TUMAP av HLA-klasse I

Kondroitinsulfatproteoglykan 4 (CSPG4)

5 CSPG4 (kondroitinsulfatproteoglykan) representerer et integrert membrankondroitinsulfatproteoglykan. Det er kjent som en tidlig celleoverflatemelanomprogresjonsmarkør implisert i stimulering av tumorcelleproliferasjon, migrering og invasjon. CSPG4 uttrykkes sterk på >90 % av humane melanomlesjoner. Selv om CSPG4 ikke er strengt tumorspesifikk, gjenkjenner tumorreaktive CD4-positive T-celleresponser hos melanompasienter og friske personer CSPG4₆₉₃₋₇₀₉ på HLA-DR11-uttrykkende melanomceller i fraværet av autoimmunitet (Erfurt et al., 2007).

15 Uttrykking av CSPG4 øker integrinformidlet celleproliferasjon, FAK-fosforylering (fokal adhesjonskinasefosforylering) og aktivering av ERK1/2 (ekstracellulær signalregulert kinase) (Yang et al., 2004). Videre er det akkumulerende bevis fra in vitro-data på at CSPG4 spiller en viktig rolle i tumorangiogenese. Dermed har CSPG4-positive tumorer vist seg å ha betydelig ekstra neovaskulariserende rater og vaskulære volumer, og CSPG4 har vist seg å sekvestrere angiostatin, som normalt hemmer endotelial celleproliferasjon og angiogenese. Umodne kar 20 inneholder også CSPG4-positive pericytter, som tyder på en rolle for denne cellepopulasjon ved modulering av endotelial celleproliferasjon ved å blokkere de hemmende effektene av angiostatin under karutvikling (Chekenya et al., 2002b).

25 CSPG4-uttrykking er også blitt beskrevet i noen normale vev foruten aktiverte pericytter så som endotelceller, kondrocytter, glatte muskelceller, visse basale keratinocytter i epidermis, så vel som celler i hårsekken (Campoli et al., 2004).

30 Under angiogenese, og i respons på patologier i sentralnervesystemet gjennomgår de svært bevegelige CSPG4-cellene raske morfologiske endringer og rekrutteres til seter der karvekst og reparasjon forekommer. CSPG4 overuttrykkes av både kreftceller og pericytter på blodårene i ondartede hjernetumorer (Chekenya and

Pilkington, 2002). Ved implantering av celler fra en CSPG4-positiv human gliomcellelinje inn i immundefekte nakne rottehjerner ble det vist at disse tumorene hadde en høyere mikrovaskulær tetthet sammenlignet med kontroller som impliserer at CSPG4-uttrykking regulerer både funksjonen og strukturen av den vertsavledede tumorvaskulaturen (Brekke et al., 2006). I et xenotransplantatforsøk av implantasjon av GBM-biopsimateriale til nakenrotter ble CSPG4 identifisert til å være hovedsakelig forbundet med blodkar på både pericytt- og basalmembrankomponentene i tumorvaskulaturen og uttrykkingen ble også forbundet med områder med høy celleproliferasjon (Chekenya et al., 2002a). Videre gikk CSPG4-uttrykkingen parallelt med progresjonen av tumoren i en gliomimplantasjonsmodell (Wiranowska et al., 2006). Malign progresjon opprettholdes av krysstale mellom tumoren og dens støttevev, der det aktive støttevevet pleier de proliferative og invasive neoplastiske cellene, ved å tilveiebringe neovaskulature, ekstracellulære matrikskomponenter, og stimulerende vekstfaktorer. I denne sammenheng spiller CSPG4 en stor rolle i tumorstromaaktivisering gjennom endringer i cellulær adhesjon, migrasjon, proliferasjon og vaskulær morfogenese (Chekenya and Immervoll, 2007).

CSPG4 uttrykkes forskjellig i humane gliomer med høyere uttrykking i gliomer med høy grad sammenlignet med gliomer med lav grad (Chekenya et al., 1999). Høy uttrykking av CSPG4 korrelerer med multilegemiddelresistens formidlet av økt aktivisering av $\alpha 3 \beta 1$ -integrin/PI3K-signalerings og deres nedstrøms mål, og fremmer celleoverlevelsen (Chekenya et al., 2008).

Fettsyrebindingsprotein 7, hjerne (IMA-FABP7-001)

Fettsyrebindingsproteiner (FABP-er) er cytosoliske proteiner på 14-15 kDa, som er ment å involveres i fettsyreopptak (FA-opptak), transport, og målretting. De antas å øke løseligheten av FA-er i cytoplasmaet ved transport av FA-er mellom membranrommene, og bringe FA-er til deres kjernemål (Glatz et al., 2002). FABP-er kan modulere FA-konsentrasjon, og på denne måten påvirke forskjellige cellulære funksjoner så som enzymatisk aktivitet, genuttrykking, cellevekst og differensiering (Glatz and Storch, 2001). Nervevev inneholder fire av de ni kjente FABP-typene med en distinkt rom-tid-distribusjon (Veerkamp and Zimmerman, 2001). FABP7 uttrykkes sterkt i radiale gliaceller gjennom hele det utviklende sentralnervesystemet, og avtar gradvis hos voksne (Feng and Heintz, 1995; Shimizu et al., 1997). Det er nødvendig for nevronindusert gliadifferensiering og

påfølgende migrering av nevroner langs gliaprosessene, men har ingen effekt på celleformering og adhesjon (Feng et al., 1994; Kurtz et al., 1994). I Schwann-celler er FABP7-uttrykkingen nedstrøms for den Ras-uavhengige EGFR-signalreaksjonsveien, og den regulerer interaksjoner mellom Schwann-celler og aksoner i normale perifere nerver og perifere nervetumorer (Miller et al., 2003).

FABP7 mRNA uttrykkes i vev av nevroepitelial opprinnelse, så vel som i maligne gliomtumorer (WHO-grad III og IV). Genet ble kartlagt til kromosombåndet 6q22-23, et område som også inneholder proto-onkogenet c-myc og ofte undergår tap av heterozygositet i malignt gliom. Analyse av maligne gliomcellelinjer viste at FABP7 ofte ko-uttrykkes med det gliafibrillære sure proteinet (GFAP) som tyder på at celleopprikkelsen av malignt gliom kan være en astrocytisk forløpercelle som har potensiale til å uttrykke begge proteinene på vanlig måte eller som resultatet av tumordannelse (Godbout et al., 1998). FABP7-protein viser moderat til sterk kjerne- og cytoplasmisk uttrykking i GBM. FABP7-transfekterte gliomceller viser 5 ganger større migrasjon enn kontrollceller. Dermed kan den kortere totale overlevelsen forbundet med FABP7-overuttrykking, spesielt i GBM, skyldes økt migrering og invasjon av tumorceller inn i det omgivende hjerneparenkymet (Liang et al., 2005). Videre analyse av FABP7-distribusjonen i astrocytomtumorer indikerer forhøyede nivåer av FABP7 i infiltrerende områder av tumorene og tyder på en viktig rolle for FABP7 i å drive infiltrasjon av maligne celler inn i tilstøtende hjernevev (Mita et al., 2007). FABP7 demonstrerer variable uttrykkningsnivåer og subcellulær lokalisering i gliavev og alle grader av astrocytom. Likevel synes spesielt nukleær lokalisering av FABP7 til å være forbundet med den infiltrerende fenotypen av gliomceller og EGFR-reaksjonsveier, ettersom dets kjernetranslokasjon detekteres etter EGFR-aktivering, og er forbundet med dårlig prognose i EGFR-positiv GBM. Dessuten kan det ikke observeres noen kjerne-FABP7-immunoreaktivitet i astrocytom av grad I (Liang et al., 2006; Kaloshi et al., 2007).

Nevroligin 4, X-bundet (IMA-NLGN4X-001)

Nevroligin 4, X-bundet er et medlem av en celleadhesjonsproteinfamilie som ser ut til å spille en rolle i modningen og funksjonen av nervesynapser. Medlemmene av nevroliginfamilien har en beslektet strukturell organisering, med et N-endsignalpeptid, det esteraselignende domenet med to seter av alternativ spleising, et lite linkerområde med lav sekvensidentitet foran det transmembrane domenet, og en kort cytosolisk del med en høyt konserververt C-

ende. De høyeste relative nevroligin-4-mRNA-nivåene ble funnet i hjertet. Lavere uttrykking ble detektert i leveren, skjelettmuskelen og bukspyttkjertelen, mens i hjernen, morkaken, lungen og nyren var nevroligin 4-mRNA knapt detekterbar (Bolliger et al., 2001).

5

Mutasjoner i det X-bundne NLGN4-genet er en mulig årsak til autistiske spektrumforstyrrelser, og mutasjoner er rapportert hos flere pasienter med autisme, Aspergers syndrom og mental retardasjon (Jamain et al., 2003; Laumonnier et al., 2004; Lawson-Yuen et al., 2008).

10

Noen assosieringer av NLGN4X med kreft er blitt beskrevet: I gastrointestinale stromale tumorer, er overuttrykkingen av NLGN4X blitt funnet i pediatriske og unge voksne versus eldre voksne tilfeller (Prakash et al., 2005).

15

Tenascin C (heksabrakion) (IMA-TNC-001)

Den ekstracellulære matriksen som omgir tumorcellene er forskjellig fra den ekstracellulære matriksen i normale vev. Tenascin-C (TNC) er et ekstracellulært matriksprotein som er sterkt oppregulert i prosesser som er nært forbundet med forhøyet migrerende aktivitet så som embryonal utvikling (Bartsch et al., 1992), sårheling (Mackie et al., 1988) og neoplastiske prosesser (Chiquet-Ehrismann, 1993; Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003). Videre overuttrykkes TNC i tumorkar som har en høy proliferativ indeks som indikerer at TNC er involvert i neoplastisk angiogenese (Kim et al., 2000). I den normale menneskehjernen detekteres uttrykkingen av TNC bare sjelden, men den uttrykkes i høye nivåer i maligne gliomer (Bourdon et al., 1983). TNC-uttrykkingen kan induseres av hypoksi (Lal et al., 2001), av TGF-betal, som tilveiebringer en mekanisme for invasjonen av gliomer av høy klasse til sunt parenkym (Hau et al., 2006), eller ved gastrin, som betydelig modulerer migreringen av humane GBM-celler (Kucharczak et al., 2001). TNC nedregulerer tropomyosin-1 og destabiliserer dermed aktinspenningfibre. Det forårsaker i tillegg nedregulering av Wnt-hemmeren Dickkopf1. Ettersom redusert tropomyosin-1-uttrykking og økt Wnt-signalerer er nært knyttet til transformasjon og tumorigenese, modulerer TNC spesifikt disse signalreaksjonsveiene for å øke proliferasjonen av gliomceller (Ruiz et al., 2004).

35

Perivaskulær farging av TNC rundt tumorleverende blodkar er observert i GBM-vev, mens det er mindre hyppig i gliomer av WHO-grad II og III, noe som

indikerer at intensiteten på TNC-fargingen korrelerer med differensieringsgraden og den sterkeste fargingen indikerer dårlig prognose (Herold-Mende et al., 2002). TNC bidrar også til genereringen av en stamcellenisje innenfor den subventrikulære sonen (SVZ), og virker ved å orkestrere vekstfaktorsignalisering for å akselerere nevralt stamcelleutvikling. Den dominerende effekten av TNC på celler i SVZ er reguleringen av utviklingsprogresjonen (Garcion et al., 2004). TNC er den sterkeste indusereren av rettet human nevralt stamcellemigrasjon (NSC-migrasjon). Den tumorproduserte ECM-en tilveiebringer dermed et ettergivende miljø for NSC-tropismen til disseminerte tumorceller (Ziu et al., 2006).

Nevronalt celleadhesjonsmolekyl (IMA-NRCAM-001)

NRCAM (nevronalt celleadhesjonsmolekyl) er et nevronalt transmembrancelleadhesjonsmolekyl med flere domener av immunoglobulinlignende C2-type og fibronektintype III. Det er involvert i veiledning, utvekst, og fassikulasjon av nevronale celler (Grumet et al., 1991; Morales et al., 1993; Stoeckli and Landmesser, 1995; Perrin et al., 2001; Sakurai et al., 2001) ved å danne homofile, samt heterofile interaksjoner med andre IgCAM-er (Volkmer et al., 1996; Sakurai et al., 1997; Zacharias et al., 1999). Ankyrinbindings-NRCAM-et (Davis and Bennett, 1994) oppreguleres i røret som danner endotelceller som tyder på en mulig rolle i rørdannelse og angiogenese (Aitkenhead et al., 2002) er et mål.

NRCAM er et målgen av β -katenin- og plakoglobin-LSF/TCF-komplekset som bidrar til onkogenese (Conacci-Sorrell et al., 2002). NRCAM-ektodomenet kan felles fra celleoverflaten ved metallproteaseenzym-lignende aktiviteter. Dette felte domenet kan aktivere forskjellige signalreaksjonsveier, forbedre cellemotilitet, og overføre tumorigenese hos mus (Conacci-Sorrell et al., 2005).

NRCAM oppreguleres i anaplastiske astrocytomer og GBM-tumorvev sammenlignet med normal hjerne, og de økte nivåene korreleres med den invasive atferden (Sehgal et al., 1998). Antisense-RNA mot NRCAM reduserer den tumorigene kapasiteten til humane GBM-celler (Sehgal et al., 1999).

Insulinlignende vekstfaktor-2-mRNA-bindingsprotein 3 (IMA-IGF2BP3-001)

IGF2BP3 er et medlem av den insulinlignende vekstfaktor-II-mRNA-bindingsproteinfamilien, implisert i mRNA-lokalisering, omsetning og translasjonell kontroll. Proteinet inneholder flere KH (K-homologe) domener, noe som er viktig i RNA-binding og er kjent for å være involvert i RNA-syntesen og metabolismen. Uttrykkinger forekommer hovedsakelig under embryonal utvikling og har blitt beskrevet for noen tumorer. Dermed anses IGF2BP3 å være et onkoføtalt protein (Liao et al., 2005). Nærværet av høye transkripsjonsnivåer av IGF2BP3 i en rekke kreftvev sammenlignet med kontrollvev indikerer at IGF2BP3-proteinet kan spille en funksjonell rolle i proliferering av transformerte celler. Denne hypotesen støttes av funnet at det eneste ikke-maligne humane vevet som uttrykker IGF2BP3-transkriptet er den humane morkaken, et vev preget av cellevekst og proliferasjon (Mueller-Pillasch et al., 1997).

Det er ingen spesifikk informasjon om IGF2BP3-uttrykking i GBM i den vitenskapelige litteraturen, men proteinet er blitt beskrevet som overuttrykt i flere andre kreftformer.

For eksempel uttrykkes IGF2BP3 i klarcelle-RCC-prøven og dens uttrykking er forbundet med fremskredet stadium og grad av primære tumorer. Videre er positiv IGF2BP3-uttrykking forbundet med en 5-10 ganger økt risiko for fjernmetastaser og med en 42-50 % økning i risikoen for å dø av RCC (Hoffmann et al., 2008; Jiang et al., 2006; Jiang et al., 2008). IGF2BP3-uttrykkingen ble også detektert i malignt melanom i forhold til benign nevi, der det ikke var noen åpenbar uttrykking, selv i nærvær av dysplastiske funksjoner (Pryor et al., 2008). Hos pasienter med spiserørsplateepitelkarsinom kunne T-celler spesifikke for et HLA-A*2402-begrenset epitopeptid fra IGF2BP3 observeres i tumorinfiltrerende lymfocytter (TIL-er), regionale lymfeknutelymfocytter og perifere blodlymfocytter i 40 % av alle tilfellene (Mizukami et al., 2008).

IGF2BP3 uttrykkes også mye i bukspyttkjertelkarsinomer. I 2 studier viste >90 % av bukspyttkjerteltumorvevsprøvene IGF2BP3-uttrykking etter immunofarging mens ikke-neoplastiske bukspyttkjertelvev var negative for IGF2BP3. Videre økte uttrykkingen progressivt med tumorstadiet (Yantiss et al., 2005; Yantiss et al., 2008). IGF2BP3-uttrykkingen viste seg også å være

vesentlig økt i høy grad av uroteliale tumorer mens den generelt ikke uttrykkes i godartet urotelium eller lavgradige uroteliale tumorer. Videre har pasienter med IGF2BP3-positive tumorer en mye lavere progresjonsfri overlevelses- og sykdomsfri overlevelsesrate enn de med IGF2BP3-negative tumorer (Li et al., 2008; Sitnikova et al., 2008; Zheng et al., 2008).

BCAN - Brevican (IMA-BCA-002)

Brevican (BCAN) er et hjernespesifikt medlem av lecticanfamilien av kondroitinsulfatproteoglykaner. To BCAN-isoformer er rapportert: en full-lengde isoform som skilles ut i den ekstracellulære matriksen og en kortere isoform med en sekvens som forutsier et glykofosfatidylinositol-(GPI)-anker. Den utskilte isoformen uttrykkes sterkt fra og med fødselen til 8-års alderen og nedreguleres etter 20-års alderen til lave nivåer som opprettholdes i den normale voksne korteksen. GPI-isoformen uttrykkes ved jevnt lave nivåer gjennom utviklingen (Gary et al., 2000). BCAN tilhører en familie av proteoglykaner som vanligvis beskrives som barriermolekyler som hindrer celle- og neurittbevegelse i det voksne nervesystemet (Viapiano and Matthews, 2006). In vivo uttrykkes BCAN rundt grensene av den rostrale migrerende strømmen (Jaworski and Fager, 2000) og er en viktig oppregulert komponent av gliaarret etter nerveskade (Jaworski et al., 1999).

BCAN viser dramatisk oppregulering i gliomer, der en omtrent sju ganger økning i uttrykkningen over normale nivåer kan detekteres (Gary et al., 2000; Gary et al., 1998). Uttrykkningen kan detekteres på de invasive grensene av eksperimentelt induserte tumorer (Glass et al., 2005) og økes i tumorer med høye infiltrerende profiler (Phillips et al., 2006). Klinisk korrelerer BCAN-oppregulering med dårlig overlevelse av pasienter med høygradige gliomer (Liang et al., 2005). I tillegg til oppregulering av BCAN i gliom, kan proteolytisk prosessering av full-lengdeproteinet også bidra til invasjon (Gary et al., 1998; Nutt et al., 2001). Spalting av BCAN ved metalloproteaser av ADAMTS-familien er et nødvendig trinn i formidling av dens pro-invasive effekt i gliom. Ved å generere en setespesifikk mutant form som er motstandsdyktig mot ADMATS-spalting ble det vist at dette «ikke-spaltbare»-BCAN-et ikke er i stand til å forbedre gliomcelleinvasjon in vitro og tumorprogresjon in vivo (Zhang et al., 1998; Viapiano et al., 2008). På molekylært nivå, fremmer BCAN EGFR-aktivering, øker uttrykkningen av celleadhesjonsmolekyler, og fremmer utskillelsen av fibronektin (Hu et al., 2008).

BCAN mRNA ble ikke detektert i prøver av voksen human korteks fra individer som døde uten nevrologiske komplikasjoner. I skarp kontrast ble BCAN mRNA oppdaget i hver og en av 27 kirurgiske prøver av human gliom og tydet dermed på at BCAN kan være en unik og selektiv markør i gliom (Jaworski et al., 1996).

BCAN-oppregulering i gliom fører ikke bare til en generelt økt uttrykking, men også til en gliomspesifikk uttrykking av differensielt glykosylerte isoformer. Dermed er B/b_{Δg} et full-lengdeprodukt av BCAN mRNA som oppstår fra en ufullstendig eller redusert glykosylering av kjerneproteinet. B/b_{Δg} uttrykkes på svært lave nivåer i løpet av den andre halvdel av prenatal og de første dagene av postnatal utvikling, forsvinner etter det første leveåret, og er fraværende fra den normale voksne hjernen, men er funnet i høygradige gliomprøver. I en studie kunne det vises at B/b_{Δg} var til stede i hver prøve av høyverdig gliom, gradene 3 og 4, og sto for halvparten av den totale overuttrykkingen ovenfor kontrollnivåer for ikke-spaltet BCAN. Prøver som var negative for B/b_{Δg} korresponderte med pasienter diagnostisert med lavgradige tumorer (Viapiano et al., 2005). Denne høyverdige gliomspesifikke uttrykkingen kunne derfor representere en reaktivering av tidlige utviklingsprogrammer, en mekanisme som har vært implisert i gliomprogresjon (Seyfried, 2001). IMA-BCA-002 inneholder et potensielt glykosyleringssete innenfor sekvensen sin. Det har vist seg å være meget immunogent i forhold til et annet peptid avledet fra BCAN (IMA-BCA-001) som ikke har noe glykosyleringssete. Videre har BCAN blitt beskrevet som selektivt overuttrykt i en type GBM-kreftstamceller som viser den høyeste pluripotensen og tumorigenisiteten in vivo (Gunther et al., 2008).

Met proto-onkogen (hepatocyttevekstfaktorreseptor) (IMA-MET-005)

MET-proto-onkogenet c-Met koder for en transmembrant tyrosinkinasereseptor som har evnen til å modulere celleproliferasjon, differensiering, motilitet, adhesjon og invasjon. Det aktiveres av hepatocyttevekstfaktoren (HGF) (Giordano et al., 1989; Trusolino and Comoglio, 2002).

c-Met signalering er involvert i organregenerering - som vist for lever og nyre, embryogenese, hematopoese, muskelutvikling, og i reguleringen av migrasjon og adhesjon av normalt aktiverte B-celler og monocytter (Naldini et al., 1991;

Mizuno et al., 1993; Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Zamegar and Michalopoulos, 1995; van der Voort et al., 1997; Beilmann et al., 2000).

Studier av ulike tumortyper har vist flere mekanismer for c-Met-aktivering, inkludert HGF/c-Met-autokrin sløyfe, aktivering av punktmutasjoner, TPR-Met-fusjonsprotein og mislykket spalting av c-MET i α - og β -kjeder (Park et al., 1986; Mondino et al., 1991; Ebert et al., 1994; Schmidt et al., 1997; Olivero et al., 1999; Park et al., 1999; Di Renzo et al., 2000). Konstitutiv c-Met-aktivering gjennom fosforylering har også blitt identifisert som en viktig mekanisme for onkogenese i human klarcellet RCC (Nakaigawa et al., 2006).

Videre indikerte en rekke studier involvering av c-Met-overuttrykking i malign transformasjon og invasivitet av maligne celler. c-Met formidler de multifunksjonelle og potensielt onkogene aktivitetene av HGF (Bottaro et al., 1991; Rubin et al., 1993; Zarnegar and Michalopoulos, 1995). Ved å binde til reseptoren, induserer HGF autofosforylering av c-Met, og aktiverer nedstrøms signaleringsarrangementer inkludert ras, fosfatidylinositol-3'-kinase, fosfolipase C og mitogenaktiverte proteinkinaserelaterte reaksjonsveier (Naldini et al., 1991; Ponzetto et al., 1993; Montesano et al., 1998; Furge et al., 2000; Dong et al., 2001; Furge et al., 2001). C-Met-genet uttrykkes hovedsakelig i epitelceller og overuttrykkes i flere maligne vev og cellelinjer (Di Renzo et al., 1995; Ferracini et al., 1995; Tuck et al., 1996; Koochekpour et al., 1997; Fischer et al., 1998; Ramirez et al., 2000; Li et al., 2001; Maulik et al., 2002; Qian et al., 2002).

c-Met-overuttrykking, ofte indusert ved tumorhypoksi, fører til konstitutiv aktivering av reseptoren, og korrelerer med dårlig prognose. Demping av det endogene c-MET-genet fører til svekkelse av gjennomføringen av det fulle invasive vekstprogrammet in vitro, mangel på tumorvekst og redusert generering av eksperimentelle metastaser in vivo (Corso et al., 2008).

c-MET-overuttrykkingen er blitt beskrevet i GBM (Tso et al., 2006). c-Met korreleres med den histologiske graden av tumoren som tyder på at dannelsen av HGF/c-MET-autokrin sløyfe opptrer sammen med progresjonen av astrocytiske hjernetumorer. Derfor antas HGF å utvise sterk migrasjons/invasjonsinduserende aktivitet for GBM-celler som bærer c-Met-reseptoren (Moriyama et al., 1999). C-Met-promotoren inneholder hypoksiinduserbare faktor-1-bindingssteder, og dermed viste hypoksi seg å

aktivere c-Met-promotoren og oppregulere dens uttrykking. Omtrent halvparten av alle humane GBM-er antas å respondere på hypoksi med en induksjon av c-Met, som kan forbedre den stimulerende effekten av HGF på tumorcellemigrering (Eckerich et al., 2007) og kan tiltrekke nevralt stamceller til tumoren (Kendall et al., 2008). c-Met og EGFR ko-uttrykkes ofte i malignt astrocytom (Reznik et al., 2008). Det ble vist at aktiveringsfosforyleringssettet på c-Met-reseptoren er svært responsiv overfor EGFRvIII-nivåer og tyder på en kryssstale mellom EGFRvIII og c-Met-reseptoren i glioblastom (Huang et al., 2007a; Huang et al., 2007b.). MET er foreslått som en markør for kreftstamceller i GBM (Nam et al., 2008). En annen studie viste at MET ble selektivt overuttrykt i en distinkt undertype av GBM-avledede kreftstamceller (Gunther et al., 2008).

De foreløpige resultatene fra en studie av fase II hos pasienter med tilbakevendende GBM ved hjelp av AMG102, et humant nøytraliserende antistoff mot HGF, tyder hos noen pasienter på at sykdommen kan være avhengig av c-MET:HGF-signalreaksjonsveien der av 18 behandlede pasienter 1 hadde en partiell respons, 1 hadde en mindre respons og 2 hadde stabil sykdom (Reardon et al., 2008).

Det er interessant at det er noen bevis på interaksjoner av MET-signaler med Wnt/betakateninreaksjonsveien ofte oppregulert ved kolorektalkreft. MET kan aktiveres av prostaglandin E2 (PGE2), og PGE2-aktivert c-Met forbindes med β -katenin og øker dens tyrosinfosforylering og induserer dermed kolorektalkreftcelleinvasivitet (Pai et al., 2003). Nylig har gjensidig aktivering av MET og betakatenin blitt beskrevet, noe som resulterer i en positiv tilbakekoblingsløkke mellom disse to sentrale aktørene i kolorektal tumorigenese (Rasola et al., 2007).

c-Met-mRNA-uttrykkingsnivået i primære CRC-tumorer ($n = 36$) er en viktig prediktiv markør for invasjon ved et tidlig stadium og regional sykdomsmetastase, og korrelerer dermed direkte med kolorektalkreftstadium (Takeuchi et al., 2003). En annen analyse av c-Met-uttrykking av 130 CRC-prøver viste overuttrykking ($T/N > 2,0$) av c-Met hos 69 % primære CRC- og betydelige høyere c-Met-nivåer i CRC med blodkarinvasjon ($P = 0,04$), og i fremskredet stadium ($P = 0,04$) og støtter rollen for c-Met i human CRC-progresjon og metastase (Zeng et al., 2004). I en annen studie viste 69 % og 48 % av 60 kolorektaladenokarsinomer henholdsvis en større enn 2- og større enn 10-gangers økning i c-Met-mRNA,

sammenlignet med tilstøtende normal slimhinne (Kammula et al., 2007). Dermed er økt c-Met-signalisering en vanlig foreteelse i CRC av tidlig stadium, men enda større uttrykking forekommer i fremskredet og metastatisk sykdom.

5 **Tabell 4: Flere immunogene peptider nyttige i en sammensetning ifølge oppfinnelsen**

SEQ ID NO	Peptid-ID	Sekvens	Gensymbol	Funksjon	binder til MHC
9	PTP-003	AIIDGVESV	PTPRZ1		HLA-A*02
10	PTP-005	KVFAGIPTV	PTPRZ1		HLA-A*02
11	CHI-001	SLWAGVVVL	CHI3L2		HLA-A*02
12	BIR-002	TLGEFLKLD RERAKN	BIRC5		HLA-DR og HLA-A*02
13	(HBV-001)	FLPSDFFPSV		kontrollpeptid	

Proteintyrosinfosfatase, reseptortype, Zeta1 (PTPRZ1, PTP-ξ)

10 PTPRZ1 er et medlem av proteintyrosinfosfatasefamilien av reseptortype og koder for et membranprotein av enkeltpasstype I med to cytoplasmatiske tyrosin-proteinfosfatasedomener, et alfa-karboanhydrasedomene og et domene av fibronektintype III. Uttrykkingen av dette genet induseres i magekreftceller (Wu et al., 2006), i brystkreft (Perez-Pinera et al., 2007), i de remyeliniserende
 15 oligodendrocyttene av lesjoner av multipel sklerose (Harroch et al., 2002), og i humane embryoniske nyreceller under hypoksiske forhold (Wang et al., 2005).

Både proteinet og transkriptet overuttrykkes i glioblastomceller, fremmer deres haptotaktiske migrasjon (Lu et al., 2005), og genomiske DNA-amplifikasjon i
 20 glioblastom (Mulholland et al., 2006).

Kitinase 3-lignende 2 (CHI3L2)

25 CHI3L2 ble opprinnelig identifisert fra kondrocytter og oppregulert i f.eks. artrose (Steck et al., 2002). Selv om proteinet ikke er godt karakterisert ennå, skilles det mest sannsynlig ut i det ekstracellulære rommet. Det har ofte blitt beskrevet som et målantigen i revmatoid artritt. Eksperimentell anti-

angiogeneseinduksjon av siRNA-transfeksjon (VEGF-A) fra en human gliomcellelinje forårsaket oppregulering av CHI3L2.

Survivin (BIRC5)

5

Uttrykking av BIRC5 (Survivin), et medlem av hemmeren av apoptoseproteinfamilien (IAP-familien) forhøyes i fostervev og i ulike humane kreftformer. Survivin synes å være i stand til å regulere både cellulær proliferasjon og apoptotisk celledød. Spesielt i glioblastom er svært høye nivåer av survivinuttrykking detekterbar (Angileri et al., 2008). Det tydes på at survivinoveruttrykking i hjerne gliomer kan spille en viktig rolle i malign proliferasjon, anti-apoptose og angiogenese (Zhen et al., 2005; Liu et al., 2006). Spesielt for glioblastom, men også for andre tumortyper, ble survivinuttrykking signifikant assosiert med malignitetsgrad (med høyest survivinuttrykking i glioblastom) og kortere totale overlevelsestider sammenlignet med pasienter som hadde survivinnegative tumorer (Kajiwara et al., 2003; Saito et al., 2007; Uematsu et al., 2005; Mellai et al., 2008; Grunda et al., 2006; Xie et al., 2006; Sasaki et al., 2002; Chakravarti et al., 2002).

10

15

20

Hepatitt-B-kjerneantigen

For hepatitt-B-viruset (HBV) er immunogene peptider av kjerneprotein HBc godt kjent (Bertoletti et al., 1993; Livingston et al., 1997). Et peptid med ti aminosyrer fra Hbc kan inkluderes som en positiv kontroll for pasientens immunkompetanse, og vellykkede immuniseringer i kreftvaksiner basert på den foreliggende oppfinnelsen.

25

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen omfatter den farmasøytiske sammensetningen minst to peptider som inneholder en aminosyresekvens ifølge SEQ ID NO 2 og en aminosyresekvens ifølge SEQ ID NO 3.

30

I en enda mer foretrukket utførelsesform omfatter den farmasøytiske sammensetningen minst ett peptid som inneholder en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO 1, og SEQ ID NO 4 til SEQ ID NO 12, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

35

Ytterligere foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen omfatter minst 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 eller 12 peptider, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

Den farmasøytiske sammensetningen kan videre inneholde ytterligere peptider og/eller hjelpestoffer for å være mer effektive, slik det vil bli nærmere forklart nedenfor.

5

Med en «varierende aminosyresekvens» for den gitte aminosyresekvensen mener oppfinnerne at sidekjedene, for eksempel, en eller to av aminosyrerestene endres (for eksempel ved å erstatte dem med sidekjeden av en annen naturlig forekommende aminosyrerest eller en annen sidekjede), slik at peptidet fortsatt er i stand til å binde til et HLA-molekyl på vesentlig samme måte som et peptid som består av den gitte aminosyresekvensen. For eksempel kan et peptid modifiseres slik at det i det minste opprettholder, hvis ikke forbedrer, evnen til å interagere med og binde et egnet MHC-molekyl, så som HLA-A, eller -DR, og slik at det i det minste opprettholder, hvis ikke forbedrer, evnen til å generere aktivert CTL som kan gjenkjenne og drepe celler som uttrykker et polypeptid som inneholder en aminosyresekvens som definert i aspektene ved oppfinnelsen. Som det kan avledes fra databasen er visse posisjoner av HLA-A-bindende peptider vanligvis ankerrester som danner en kjernesekvens som passer til bindingsmotivet av HLA-bindingssporet.

20

De aminosyrerestene som ikke er essensielle for å interagere med T-cellereseptoren kan modifiseres ved erstatning med en annen aminosyre hvis inkorporering ikke i vesentlig grad påvirker T-cellereaktiviteten og ikke eliminerer binding til den relevante MHC-en. Dermed, bortsett fra det gitte forbeholdet, kan peptidet som beskrevet være ethvert peptid (med hvilket uttrykk oppfinnerne inkluderer oligopeptid eller polypeptid) som inkluderer aminosyresekvensene eller en del eller variant av disse som gitt.

25

Det er videre kjent for presenterte peptider av MHC-klasse II at disse peptidene settes sammen av en «kjernesekvens» som har et visst HLA-spesifikt aminosyremotiv og eventuelt N- og/eller C-enderforlengelser som ikke forstyrrer funksjonen av kjernesekvensen (dvs. anses som irrelevant for interaksjonen av peptidet og T-cellen). N- og/eller C-enderforlengelsene kan for eksempel være mellom henholdsvis 1 og 10 aminosyrer i lengde. Disse peptidene kan anvendes enten direkte for å laste molekyler av MHC-klasse II eller sekvensen kan klones i vektorene ifølge beskrivelsen nedenfor i dette dokumentet. Ettersom disse peptidene danner sluttproduktet av behandlingen av større peptider i cellen, kan

30

35

det også anvendes lengre peptider. Peptidene ifølge oppfinnelsen kan være av hvilken som helst størrelse, men de kan vanligvis være mindre enn 100 000 i molekylvekt, fortrinnsvis mindre enn 50 000, mer foretrukket mindre enn 10 000, mer foretrukket mindre enn 5 000, mer foretrukket mindre enn 2 500 og vanligvis ca. 1000 til 2000. Når det gjelder antallet aminosyrerester kan peptidene ifølge oppfinnelsen ha færre enn 1000 rester, fortrinnsvis færre enn 500 rester, mer foretrukket færre enn 100 rester.

Tilsvarende er varianter som induserer T-celler som kryssreagerer med et peptid ifølge oppfinnelsen ofte lengdevarianter.

Hvis det anvendes et peptid som er lengre enn rundt 12 aminosyrerester direkte til å binde til et molekyl av MHC-klasse II, er det foretrukket at restene som flankerer det kjerne-HLA-bindende området ikke i vesentlig grad påvirker peptidets evne til å binde spesifikt til bindingssporet av molekylet av MHC-klasse II, eller å fremstille peptidet til CTL-en. Imidlertid, som allerede antydnet ovenfor, vil det forstås at det kan anvendes større peptider, spesielt når de kodes for av et polynukleotid, ettersom disse større peptidene kan fragmenteres ved hensiktsmessige antigenpresenterende celler.

Det er også mulig at epitoper av MHC-klasse I, men vanligvis mellom 8-10 aminosyrer lange, genereres ved peptidbehandling av lengre peptider eller proteiner som inkluderer selve epitopen. I likhet med epitoper av MHC-klasse II er det foretrukket at de flankerende restene av langstrakte forløperpeptider oppstrøms og/eller nedstrøms for N- og C-enden, med selve epitopen ikke i vesentlig grad påvirker presentasjonen av peptidet til CTL-et eller maskerer setene for proteolytisk spalting nødvendig for å gi det aktuelle epitopet formidlet ved behandling av det langstrakte peptidet.

Selvsagt vil peptidet følge den foreliggende oppfinnelsen ha evnen til å binde til et molekyl av human MHC-klasse I. Binding av et peptid til et MHC-kompleks kan testes ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent i teknikken, for eksempel de som er beskrevet i eksemplene ifølge den foreliggende oppfinnelsen nedenfor eller de som er beskrevet i litteraturen for forskjellige alleler av MHC-klasse II (f.eks. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R; Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides; J Immunol. 1994; 153(4):1665-1673;

Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A; Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands; J Immunol. 1994; 153(3):1141-1149; Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP; Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11; J Exp Med. 1999; 189(5): 871-876; Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F; Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association; J. Exp Med. 1995 181(5):1847-1855; Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE; A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins; J Immunol Methods. 1993;163(2): 209-216; Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Halder T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM; Glutamic acid decarboxylase T lymphocyte responses associated with susceptibility or resistance to type I diabetes: analysis in disease discordant human twins, non-obese diabetic mice and HLA-DQ transgenic mice; Int Immunol. 1998 (12):1765-1776).

Flere N- og/eller C-ender lokaliserte strekninger av aminosyrer som ikke nødvendigvis danner en del av peptidet som virker som det faktiske epitopet for MHC-molekyler, men kan likevel være viktig for å tilveiebringe en effektiv innføring av peptidet ifølge den foreliggende oppfinnelsen inn i cellene. Peptidet ifølge den foreliggende oppfinnelsen er beskrevet som del av et fusjonsprotein som omfatter for eksempel de 80 N-endeaminosyrene av den HLA-DR-antigenassosierte konstante kjeden (p33, i det følgende «Ii») som avledet fra NCBI, GenBank-aksesjonsnummer X00497 (Strubin, M., Mach, B. and Long, E.O. Den komplette sekvensen av mRNA-et for den HLA-DR-assosierte konstante kjeden avdekker et polypeptid med en uvanlig transmembranpolaritet EMBO J. 3 (4), 869-872 (1984)).

I tillegg kan peptidet modifiseres ytterligere for å forbedre stabiliteten og/eller bindingen til MHC-molekyler for å fremkalle en sterkere immunrespons. Fremgangsmåter for en slik optimalisering av en peptidsekvens er godt kjente i teknikken og inkluderer for eksempel innføringen av omvendte peptidbindinger eller ikke-peptidbindinger.

Dermed, ifølge et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en farmasøytisk sammensetning, der minst ett peptid inkluderer ikke-peptidbindinger.

I en omvendt peptidbinding forenes ikke aminosyrerestene med peptidbindinger (-CO-NH-bindinger), men peptidbindingen reverseres. Slike retro-inverso peptidetterligninger kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent i teknikken, for eksempel slik som de som er beskrevet i Meziere et al (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, innført i dette dokumentet ved referanse. Denne tilnærmingen involverer å fremstille pseudopeptider som inneholder endringer som involverer ryggraden, og ikke orienteringen av sidekjeder. Meziere et al (1997) viser at disse pseudopeptidene er nyttige for MHC og T-hjelpercelleresponser. Retro-inverse peptider, som inneholder NH-CO-bindinger i stedet for CO-NH-peptidbindinger, er mye mer motstandsdyktige mot proteolyse.

En ikke-peptidbinding er for eksempel -CH₂-NH, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- og -CH₂SO-. Amerikansk patent 4,897,445 tilveiebringer en fremgangsmåte for fastfasesyntesen av ikke-peptidbindinger (-CH₂-NH) i polypeptidkjeder som involverer polypeptider syntetisert ved standard prosedyrer og ikke-peptidbindingen syntetisert ved omsetning av et aminoaldehyd og en aminosyre i nærvær av NaCNBH₃.

Peptider omfattende sekvensene ifølge oppfinnelsen beskrevet ovenfor kan syntetiseres med andre kjemiske grupper som er til stede på deres amino- og/eller karboksylender, for å styrke for eksempel stabiliteten, biotilgjengeligheten og/eller affiniteten av peptidene. For eksempel kan hydrofobe grupper så som for eksempel karbobenzoksyl-, dansyl- eller t-butyloksykarbonylgrupper tilsettes til peptidenes aminoender. Likeledes kan en acetylgruppe eller en 9-fluorenylmetoksy-karbonylgruppe plasseres i peptidenes aminoender. I tillegg kan f.eks. den hydrofobe gruppen, t-butyloksykarbonyl eller en amidogruppe tilsettes til peptidenes karboksyender.

Videre kan alle peptidene ifølge oppfinnelsen syntetiseres for å endre deres steriske konfigurasjon. For eksempel kan D-isomeren av en eller flere av aminosyrerestene i peptidet anvendes i stedet for den vanlige L-isomeren.

Tilsvarende kan et peptid ifølge oppfinnelsen modifiseres kjemisk ved omsetning av spesifikke aminosyrer enten før eller etter syntesen av peptidet. Eksempler på slike modifikasjoner er godt kjente innen teknikken og er oppsummert i f.eks. R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3. utg. CRC Press, 2005,

som innføres i dette dokumentet ved referanse. Kjemisk modifikasjon av aminosyrer inkluderer, men er ikke begrenset til, modifikasjon ved acylering, amidering, pyridoksylering av lysin, reduktiv alkylering, trinitrobenzylering av aminogrupeer med 2,4,6-trinitrobenzensulfonsyre (TNBS), amidmodifikasjon av karboksylgrupper og sulfhydrylmodifikasjon av permaursyreoksidasjon av cystein til cysteinsyre, dannelse av kvikksølvderivater, dannelse av blandede disulfider med andre tiolforbindelser, omsetning med maleimid, karboksymetylering med jodeddiksyre eller jodacetamid og karbamoylering med cyanat ved alkalisk pH, men uten begrensning til dette. I dette henseende refererer fagmannen til kapittel 15 i Current Protocols In Protein Science, red. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000) for mer omfattende metodikk knyttet til kjemisk modifikasjon av proteiner.

Vellykket modifikasjon av terapeutiske proteiner og peptider med PEG er ofte forbundet med en forlengelse av sirkulasjonshalveringstid, mens kryssbinding av proteiner med glutaraldehyd, polyetylenglykoldiakrylat og formaldehyd anvendes for fremstillingen av hydrogeler. Kjemisk modifikasjon av allergener for immunterapi oppnås ofte ved karbamylering med kaliumcyanat.

Generelt kan peptider (i det minste de som inneholder peptidbindinger mellom aminosyrerester) syntetiseres, f.eks. ved hjelp av Fmoc-polyamidmodusen av peptidsyntese av fast fase som offentliggjort av Lu et al (1981) J. Org. Chem. 46, 3433 og referanser deri.

Rensingen kan utføres av hvilken som helst, eller en kombinasjon av fremgangsmåter, så som rekrySTALLISASJON, størrelseseksklusionskromatografi, ionebytterkromatografi, hydrofob interaksjonskromatografi og (vanligvis) reversfasehøyytelsesvæskeskromatografi ved anvendelse av f.eks. acetonitril/vanngradientseparasjon.

Analyse av peptider kan utføres ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi, elektroforese, spesielt kapillær elektroforese, fastfaseekstraksjon (CSPE), reversfasehøyytelsesvæskeskromatografi, aminosyreanalyse etter sur hydrolyse og ved hurtig atombombardement (FAB) massespektrometrisk analyse, så vel som MALDI- og ESI-Q-TOF-massespektrometrisk analyse.

Det er beskrevet en nukleinsyre (f.eks. polynukleotid) som koder for et peptid ifølge oppfinnelsen. Polynukleotidet kan være f.eks. DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA, enten enkelt- og/eller dobbelttrådet, eller opprinnelige eller stabiliserte former av polynukleotider, så som f.eks. polynukleotider med en fosforotiatryggrad, eller kombinasjoner av disse, og det kan eller kan ikke inneholde introner så lenge det koder for peptidet. Selvsagt er det bare peptider som inneholder naturlig forekommende aminosyrerester forent av naturlig forekommende peptidbindinger som kodes for av et polynukleotid. Det er beskrevet en uttrykkingsvektor som er i stand til å uttrykke et peptid ifølge oppfinnelsen. Uttrykkingsvektorer for forskjellige celletyper er godt kjente innen teknikken og kan velges uten unødig eksperimentering.

Generelt innføres DNA-et i en uttrykkingsvektor, så som et plasmid, i riktig orientering og korrekt leseramme for uttrykking. Om nødvendig kan DNA-et knyttes til de hensiktsmessige transkripsjons- og translasjonsregulerende kontrollnukleotidsekvensene som gjenkjennes av den ønskede verten, selv om slike kontroller generelt er tilgjengelige i uttrykkingssvektoren. Vektoren innføres deretter i verten via standard fremgangsmåter. Man kan finne veiledning i f.eks. Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

I en spesielt foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter imidlertid den farmasøytiske sammensetningen et peptid som består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO 2, og et peptid som består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO 3.

Den optimale mengden av hvert peptid som skal inkluderes i vaksinen og det optimale doseringsregimet kan bestemmes av en fagmann innen teknikken uten unødig eksperimentering. For eksempel kan peptidet eller dets variant fremstilles for intravenøs (i.v.) injeksjon, subkutan (s.c.) injeksjon, intradermal (i.d.) injeksjon, intraperitoneal (i.p.) injeksjon, intramuskulær (i.m.) injeksjon. Foretrukne peptidinjeksjonsveier er s.c., i.d., i.p., i.m. og i.v. Foretrukne DNA-injeksjonsveier er i.d., i.m., s.c., i.p. og i.v. Doser på f.eks. mellom 1 og 500 mg, 50 µg og 1,5 mg, fortrinnsvis 125 µg til 500 µg, av peptid eller DNA kan gis, og vil avhenge av det respektive peptidet eller DNA-et. Dosene i dette området ble brukt med hell i tidligere studier (Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G; Telomerase peptide vaccination: a phase I/II

study in patients with non-small cell lung cancer; Cancer Immunol Immunother. 2006; 55(12):1553-1564; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, ASCO meeting 2007; Abstract No 3017).

Den nye farmasøytiske sammensetningen kan settes sammen slik at valget, antallet og/eller mengden av peptider som er til stede i sammensetningen er vev-, kreft- og/eller pasientspesifikk. For eksempel kan det nøyaktige valget av peptider styres av uttrykkmønstre av moderproteinene i et gitt vev for å unngå bivirkninger. Valget kan avhenge av den spesifikke kreftformen som pasienten som skal behandles lider av samt statusen for sykdommen, tidligere behandlingsregimer, immunstatusen til pasienten, og selvfølgelig, HLA-haplotypen til pasienten. Dessuten kan vaksinen ifølge oppfinnelsen inneholde individuelle komponenter, ifølge personlige behov til den bestemte pasienten. Eksempler er forskjellige mengder av peptider ifølge uttrykkningen av de relaterte TAA-ene hos den bestemte pasienten, uønskede bivirkninger på grunn av personlige allergier eller andre behandlinger, og justeringer for sekundære behandlinger etter en første runde eller behandlingsplan.

For sammensetninger som skal anvendes som en vaksine for f.eks. GBM vil peptider hvis moderproteiner uttrykkes i store mengder i normale vev unngås eller være til stede i små mengder i sammensetningen ifølge oppfinnelsen. På den annen side, hvis det er kjent at tumoren til en pasient uttrykker store mengder av et visst protein, kan den respektive farmasøytiske sammensetningen for behandling av denne kreften være til stede i store mengder og/eller mer enn ett peptid som er spesifikt for dette bestemte proteinet eller reaksjonsveien for dette proteinet kan inkluderes. Fagpersonen vil være i stand til å velge foretrukne kombinasjoner av immunogene peptider ved testing, for eksempel genereringen av T-celler in vitro, så vel som deres effektivitet og generelle nærvær, spredning, proliferasjon, affiniteten og utvidelsen av visse T-celler for enkelte peptider, og funksjonaliteten til T-cellene, f.eks. ved å analysere IFN-gammaproduksjonen (se også eksemplene nedenfor). Vanligvis kombineres de mest effektive peptidene deretter som en vaksine for formålene som er beskrevet ovenfor.

En egnet vaksine vil fortrinnsvis inneholde mellom 2 og 20 peptider, mer foretrukket 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 eller 20 forskjellige

peptider, videre foretrukket 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13 eller 14 forskjellige peptider, og mest foretrukket 10, 11, 12, 13 eller 14 forskjellige peptider. 9-mer- eller 10-mer-peptider som beskrevet i de vedlagte tabellene 1 og 2 er peptider av MHC-klasse I, mens 12- til 15-merer er peptider av MHC-klasse II.

5

Peptidene utgjør en tumor- eller kreftvaksine. De kan administreres direkte til pasienten, inn i det påvirkede organet eller systemisk, eller påføres ex vivo til celler avledet fra pasienten eller en human cellelinje som deretter administreres til pasienten, eller anvendes in vitro for å velge en subpopulasjon av immunceller avledet fra pasienten, som deretter administreres på nytt til pasienten.

10

Peptidet kan være vesentlig rent eller kombineres med en immunstimulerende adjuvans (se nedenfor), eller anvendes i kombinasjon med immunstimulerende cytokiner, eller administreres med et hensiktsmessig leveringssystem, for eksempel liposomer. Peptidet kan også konjugeres til en egnet bærer så som nøkkelhullssneglhemocyanin (KLH) eller mannan (se WO 95/18145 og Longenecker et al (1993) Ann. NY Acad. Sci. 690,276-291). Peptidet kan også være merket, eller være et fusjonsprotein eller et hybridmolekyl. Peptidene hvis sekvens er gitt i den foreliggende oppfinnelsen forventes å stimulere CD8 CTL. Imidlertid er stimulering mer effektiv i nærværet av hjelp tilveiebrakt av T-celler positive for den motsatte CD-en. Dermed, for epitoper av MHC-klasse II som stimulerer CD4 CTL tilveiebringer fusjonspartneren eller seksjoner av et hybridmolekyl hensiktsmessig epitoper som stimulerer CD8-positive T-celler. På den annen side, for epitoper av MHC-klasse I som stimulerer CD8 CTL tilveiebringer fusjonspartneren eller seksjoner av et hybridmolekyl hensiktsmessig epitoper som stimulerer CD4-positive T-celler. CD4- og CD8-stimulerende epitoper er godt kjent i teknikken.

15

20

25

Farmasøytisk akseptable bærere er godt kjente og er vanligvis væsker, der det formuleres et aktivt terapeutisk middel. Bæreren tilveiebringer generelt ikke noen farmakologisk aktivitet til formuleringen, selv om den kan tilveiebringe kjemisk og/eller biologisk stabilitet, frigjøre egenskaper og lignende. Eksempler på formuleringer kan finnes i for eksempel Alfonso R. Gennaro. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20. utgave. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000 og inkluderer, men er ikke begrenset til, saltløsning, vann, bufret vann, 0,3 % glysin, hyaluronsyre, dekstrose og lignende. Nylig ble det funnet at visse fettemulsjoner, som har vært i bruk i mange år for intravenøs ernæring av humane pasienter, også kan opptre som en bærer for peptider. To

30

35

eksempler på slike emulsjoner er de tilgjengelige kommersielle fettemulsjonene som er kjent som Intralipid og Lipofundin. «Intralipid» er et registrert varemerke fra Kabi Pharmacia, Sverige, for en fettemulsjon for intravenøs ernæring, beskrevet i U.S. pat. nr. 3,169,094. «Lipofundin» er et registrert varemerke for B. Braun Melsungen, Tyskland. Begge inneholder soyabønneolje som fett (100 eller 200 g i 1 000 ml destillert vann: henholdsvis 10 eller 20 %). Eggeplommefosfolipider anvendes som emulgatorer i Intralipid (12 g/l destillert vann) og eggeplommelecitin i Lipofundin (12 g/l destillert vann). Isotonisiteten oppstår fra tilsetningen av glyserol (25 g/l) både i intralipid og Lipofundin.

For å utløse en immunrespons er det vanligvis nødvendig å inkludere eksipienter som gjør sammensetningen mer immunogen. I en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter dermed den farmasøytiske sammensetningen videre minst en egnet adjuvans.

Adjuvanter er stoffer som ikke-spesifikt forsterker eller potensierte immunresponsen (f.eks. immunresponser formidlet av CTL-er og T-hjelperceller ((T_H)-celler) til et antigen, og ville derfor betraktes som nyttige i medikamentet ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Egnede adjuvanter inkluderer, men er ikke begrenset til, 1018 ISS, aluminiumsalter, Amplivax, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, Mologens dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, interferon-alfa eller -beta, IS Patch, ISS, ISCOMs, JuvImmune, LipoVac, MF59, monofosforyl lipid A, og andre ikke-toksiske LPS-derivater, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PepTel®-vektorsystem, PLG-mikropartikler, resiquimod, SRL172, virosomer og andre viruslignende partikler, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glukan, Pam3Cys, Aquilas QS21 stimulon (Aquila Biotech, Worcester, MA, USA) som avledes fra saponin, mykobakterielle ekstrakter og syntetiske bakteriecelleveggetterlignere og andre proprietære adjuvanter så som Ribis detoks. Quil eller Superfos. Adjuvanter så som Imiquimod, Resiquimod, ufullstendig Freund's GM-CSF er foretrukket. Flere immunologiske adjuvanter (f.eks. MF59) spesifikk for dendrittceller og deres fremstilling er blitt beskrevet tidligere (Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM; Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison AC; The mode of action of immunological adjuvants; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11). Også cytokiner kan anvendes. Flere cytokiner er blitt direkte koblet til å påvirke dendrittcellemigrering

til lymfoid vev (for eksempel TNF- α), akselerere modningen av dendrittceller til effektive antigenpresenterende celler for T-lymfocytter (for eksempel GM-CSF, IL-1 og IL-4) (U.S. pat. nr. 5,849,589, spesifikt innført i dette dokumentet som referanse i sin helhet), og opptre som immunadjuvaner (f.eks. IL-12) (Gabrilovich DI, Cunningham HT, Carbone DP; IL-12 og mutante peptid-P53-peptidpulsede dendrittceller for den spesifikke immunterapien av kreft; J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418).

CpGJ-immunstimulerende oligonukleotider har også blitt rapportert å forsterke effektene av adjuvaner i en vaksineinnstilling. Uten å være bundet av teori opptre CpG-oligonukleotider ved å aktivere det medfødte (ikke-adaptive) immunsystemet via Toll-lignende reseptorer (TLR), hovedsakelig TLR9. CpG-trigget TLR9-aktivering forbedrer antigenspesifikke humorale og cellulære responser til en rekke forskjellige antigener, inkludert peptid- eller proteinantigener, levende eller drepte virus, dendrittcellevaksiner, autologe cellulære vaksiner og polysakkaridkonjugater i både profylaktiske og terapeutiske vaksiner. Enda viktigere forbedrer det dendrittcelleutvikling og differensiering, noe som resulterer i økt aktivering av T_{H1}-celler og sterk cytotoxisk T-lymfocytgenerasjon (CTL-generasjon), selv i fravær av CD4-T-cellehjelpen. TH1-avviket induert ved TLR9-stimulering opprettholdes selv i nærvær av vaksineadjuvaner så som alum eller ufullstendig Freund's adjuvans (IFA) som normalt fremmer et TH2-avvik. CpG-oligonukleotider viser enda større adjuvansaktivitet når de formuleres eller ko-administreres med andre adjuvaner eller i formuleringer så som mikropartikler, nanopartikler, lipidemulsjoner eller tilsvarende formuleringer, som er spesielt nødvendig for å indusere en sterk reaksjon når antigenet er relativt svakt. De akselererer også immunresponsen og muliggjorde at antigendosene kunne reduseres med ca. to størrelsesordener, med sammenlignbare antistoffresponser til fulldosevaksinen uten CpG i noen forsøk (Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, Nature Reviews, Drug Discovery, 2006, 5, 471-484). U.S. pat. nr. 6,406,705 B1 beskriver den kombinerte anvendelsen av CpG-oligonukleotider, ikke-nukleinsyreadjuvaner og et antigen for å indusere en antigenspesifikk immunrespons. En kommersielt tilgjengelig CpG TLR9-antagonist er dSLIM (dobbel stammeløkkeimmunomodulator) fra Mologen (Berlin, Tyskland), som er en foretrukket komponent i den farmasøytiske sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Andre TLR-bindende molekyler så som RNA som binder TLR 7, TLR 8 og/eller TLR 9 kan også anvendes.

Andre eksempler på nyttige adjuvanter inkluderer, men er ikke begrenset til, kjemisk modifiserte CpG-er (f.eks. CpR, Idera), Poly(I:C) (f.eks. polyI:C12U), ikke-CpG-bakterielt DNA eller RNA, så vel som immunoaktive små molekyler og antistoffer så som imidazoquinoliner, syklofosfamid, sunitinib, bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafinib, XL-999, CP-547632, pazopanib, ZD2171, AZD2171, ipilimumab, tremelimumab og SC58175, som kan opptre terapeutisk og/eller som en adjuvant. Mengdene og konsentrasjonene av adjuvanter og additiver som er nyttige i sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen kan lett bestemmes av fagmannen uten unødig eksperimentering.

Foretrukne adjuvanter er dSLIM, BCG, OK432, Imiquimod, resiquimod, GM-CSF, interferon-alfa, PeviT_{er} og JuvImmune eller kombinasjoner av disse.

I en foretrukket utførelsesform velges den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen adjuvansen fra gruppen som består av kolonistimulerende faktorer, så som granulocyttmakrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF, sargramostim), imiquimod, resiquimod og interferon-alfa.

I en foretrukket utførelsesform ifølge den farmasøytiske sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelsen er adjuvansen Imiquimod eller resiquimod.

Denne sammensetningen anvendes for parenteral administrering, så som subkutan, intradermal, intramuskulær, intraperitoneal eller oral administrering. For dette løses peptidene og eventuelt andre molekyler opp eller suspenderes i en farmasøytisk akseptabel, fortrinnsvis vandig bærer. I tillegg kan sammensetningen inneholde eksipienser, så som buffere, bindemidler, sprengningsmidler, fortynningsmidler, smaksstoffer, smøremidler osv. Peptidene kan også administreres sammen med immunstimulerende stoffer, så som cytokiner. En omfattende oversikt over eksipienser som kan anvendes i en slik sammensetning kan for eksempel tas fra A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. utg. 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press. Sammensetningen kan anvendes for en forebygging, profylakse og/eller terapi av adenomatøse sykdommer eller kreftsykdommer, fortrinnsvis CRC.

Cytotoksiske T-celler (CTL-er) gjenkjenner et antigen i form av et peptid bundet til et MHC-molekyl i stedet for det intakte fremmede antigenet i seg selv. MHC-

molekylet i seg selv er lokalisert på celleoverflaten av en antigenpresenterende celle. Dermed er en aktivering av CTL-er bare mulig hvis et trimert kompleks av peptidantigen, MHC-molekyl og APC er til stede. Tilsvarende kan det styrke immunresponsen hvis ikke bare peptidet anvendes for aktivering av CTL-er, men

5 hvis i tillegg APC-er med det respektive MHC-molekylet tilsettes.

I en foretrukket utførelsesform inneholder den farmasøytiske sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelsen i tillegg til minst en antigenpresenterende celle.

10 Den antigenpresenterende cellen (eller stimulatorcellen) har vanligvis et molekyl av MHC-klasse I eller II på overflaten sin, og i en utførelsesform er den i det vesentlige ute av stand til selv å laste molekylet av MHC-klasse I eller II med det valgte antigenet. Slik det er beskrevet mer detaljert nedenfor, kan molekylet av MHC-klasse I eller II lett lastes med det valgte antigenet in vitro.

15 Fortrinnsvis mangler eller har pattedyrcellen et redusert nivå eller redusert funksjon av TAP-peptidtransportøren. Egnede celler som mangler TAP-peptidtransportøren inkluderer T2, en human cellelinje med mangelfull peptidbinding som er tilgjengelig fra American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland

20 20852, USA under katalog nr. CRL 1992; TAP-manglende cellelinjer så som T2 kan anvendes som APC-er, og på grunn av mangelen av TAP vil nesten alle peptider som presenteres av MHC-klasse I være peptidene under granskning som anvendes for eksternt å laste molekylene av den tomme MHC-klassen I av disse cellelinjene, og dermed vil alle effektene klart skyldes de anvendte peptidene.

25 Fortrinnsvis er de antigenpresenterende cellene dendrittceller. Hensiktsmessig er dendrittcellene autologe dendrittceller som pulses med et antigen peptid. Det antigene peptidet kan være hvilket som helst egnet antigen peptid som gir opphav til en passende T-cellerespons. T-celleterapi som anvender autologe dendrittceller pulsert med peptider fra et tumorforbundet antigen er offentliggjort i Murphy et al

30 (1996) The Prostate 29, 371-380, and Tjua et al (1997) The Prostate 32, 272-278.

I en foretrukket utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelsen vil dermed den farmasøytiske sammensetningen inneholdende minst én

35 antigenpresenterende celle pulses eller lastes med peptidet, for eksempel ved fremgangsmåten ifølge eksempel 4.

Som et alternativ omfatter den antigenpresenterende cellen en uttrykkingskonstruksjon som koder for peptidet. Polynukleotidet kan være hvilket som helst egnet polynukleotid og det foretrekkes at det er i stand til å transducere dendrittcellen, og dermed resultere i fremstillingen av et peptid og induksjon av immunitet.

Hensiktsmessig kan en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen omfattes i et viralt polynukleotid eller virus. For eksempel har adenovirustransduserte dendrittceller vist seg å indusere antigenspesifikk antitumorimmunitet i forhold til MUC1 (se Gong et al (1997) Gene Ther. 4, 1023-1028). På lignende måte kan det anvendes adenovirusbaserte systemer (se for eksempel Wan et al (1997) Hum. Gene Ther. 8, 1355-1363); og retrovirale systemer (Specht et al (1997) J. Exp. Med. 186, 1213-1221 og Szabolcs et al (1997) Blodpartikkelformidlet overføring til dendrittceller kan også anvendes (Tuting et al (1997) Eur. J. Immunol. 27, 2702-2707); og RNA kan også anvendes (Ashley et al (1997) J. Exp. Med. 186, 1177 1182).

Generelt kan en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen som inneholder (a) nukleinsyre(r) ifølge oppfinnelsen administreres på lignende måte som de som inneholder peptidet/peptidene ifølge oppfinnelsen, f.eks. intravenøst, intraarterielt, intraperitonealt, intramuskulært, intradermalt, intratumoralt, oralt, dermalt, nasalt, bukkalt, rektalt, vaginalt, ved innånding, eller ved topisk administrering.

Som følge av unnvikelsesmekanismer utvikler en tumor ofte resistens mot legemidlet den behandles med. Legemiddelresistensen kan oppstå under behandling og manifesterer seg selv i metastaser og tilbakevendende tumorer. For å unngå en slik legemiddelresistens behandles en tumor ofte med en kombinasjon av legemidler og metastaser og tumorer som vender tilbake etter en sykdomsfri periode krever ofte en annen kombinasjon. Den farmasøytiske sammensetningen kan administreres i kombinasjon med et andre antikreftmiddel. Det andre midlet kan administreres før, etter eller samtidig med den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen. En samtidig administrering kan f.eks. oppnås ved å blande den farmasøytiske sammensetningen med det andre antikreftmidlet hvis kjemiske egenskaper er compatible. En annen samtidig administreringsmåte er administreringen av sammensetningen og antikreftmidlet på den samme dagen uavhengig av administreringsveien, slik at den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen f.eks. kan injiseres mens det andre antikreftmidlet for eksempel gis oralt. Den farmasøytiske sammensetningen

og andre antikreftmidlet kan også administreres i det samme behandlingsforløpet, men på forskjellige dager, og/eller innen separate behandlingsløp.

5 Det er beskrevet en fremgangsmåte for å behandle eller forebygge en kreft hos en pasient omfattende administrering til pasienten av en terapeutisk effektiv mengde av hvilken som helst av de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen.

10 En terapeutisk effektiv mengde vil være en mengde som er tilstrekkelig til å indusere en immunrespons, særlig en aktivering av en underpopulasjon av CTL-er. En fagmann innen teknikken kan lett bestemme hvorvidt en mengde er effektiv ved hjelp av standard immunologiske fremgangsmåter, så som de som tilveiebringes i eksemplene i de foreliggende spesifikasjonene. En annen måte å overvåke effekten av en viss mengde av den farmasøytiske sammensetningen på er å observere veksten av den behandlede tumoren og/eller dens tilbakevending.

15 I en spesielt foretrukket utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelsen anvendes den farmasøytiske sammensetningen som en anti-kreftvaksine.

20 Sammensetningen som inneholder peptider kan også utgjøre en tumor- eller kreftvaksine. Den kan administreres direkte til pasienten, inn i det påvirkede organet eller systemisk, eller påføres ex vivo til celler avledet fra pasienten eller en human cellelinje som deretter administreres til pasienten, eller anvendes in vitro for å velge en underpopulasjon fra immunceller avledet fra pasienten, som deretter administreres på nytt til pasienten.

25 Sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan anvendes i en fremgangsmåte for behandling av, eller anvendes som en vaksine mot kreft. Kreftformen kan være kreft i munnhulen og svelget, kreft i fordøyelseskanalen, kreft i tykktarmen, rektum og anus, kreft i luftrøret, brystkreft, livmorhalskreft, vagina og vulva, livmor- og eggstokkreft, kreft i det mannlige kjønnsorganet, kreft i urinveiene, kreft i benet og mykt vev, og Kaposi sarkom, melanom i huden, øyemelanom og ikke-melanomøyekreft, kreft i hjernen og sentralnervesystemet, kreft i skjoldbruskkjertelen og andre endokrine kjertler, Hodgkins lymfom, ikke-Hodgkins lymfom, og myelom, fortrinnsvis nyrekreft, kolorektalkreft, lungekreft, brystkreft, kreft i bukspyttkjertelen, prostatakreft, magekreft, kreft i hjernen, GIST eller glioblastom, fortrinnsvis hjernetumorer og enda mer foretrukket glioblastomer.

35

I den mest foretrukne utførelsesformen av fremgangsmåten for behandling eller vaksine ifølge oppfinnelsen er vaksinen en tumorvaksine av flere peptider for behandling av GBM. Vaksinen omfatter et peptid som består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO 2, og et peptid som består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO 3, og eventuelt minst ett ytterligere peptid som består av en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO 1 og SEQ ID NO 4 til SEQ ID NO 12 som er plassert og har blitt identifisert på primære glioblastomceller. Dette settet inneholder peptider av HLA-klasse I og klasse II. Peptidsettet kan også inneholde minst ett peptid, så som fra HBV-kjerneantigenet, anvendt som et positivt kontrollpeptid som tjener som immunmarkør for å teste effektiviteten av den intradermale administreringen. I en spesiell utførelsesform består vaksinen av 14 individuelle peptider (ifølge SEQ ID No. 1 til SEQ ID No. 12) med mellom ca. 1 500 µg til 75 µg, foretrukket mellom ca. 1 000 µg til ca. 750 µg, og mer foretrukket mellom ca. 500 µg til ca. 600 µg, og mest foretrukket ca. 578 µg av hvert peptid, som alle kan renses ved hjelp av HPLC og ionebytterkromatografi og viser seg som et hvitt til offwhite pulver. Lyofilisatet løses fortrinnsvis opp i natriumhydrogenkarbonat, og anvendes for intradermal injeksjon i løpet av 30 min etter rekonstituering ved romtemperatur. Ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan foretrukne mengder av peptider variere mellom ca. 0,1 og 100 mg, fortrinnsvis mellom ca. 0,1 til 1 mg, og mest foretrukket mellom ca. 300 til 800 µg per 500 µl løsning. I dette dokumentet skal uttrykket «ca.» bety +/- 10 prosent av den gitte verdien, hvis ikke annet er oppgitt. Fagpersonen vil være i stand til å justere den faktiske mengden av peptidet som skal anvendes basert på flere faktorer, så som for eksempel immunstatusen hos den individuelle pasienten og/eller mengden av TUMAP som presenteres i en bestemt type kreft. Peptidene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan tilveiebringes i andre egnede former (sterile løsninger osv.) i stedet for et lyofilisat.

De farmasøytiske sammensetningene omfatter peptidene, enten i fri form eller i form av et farmasøytisk akseptabelt salt.

Som anvendt i dette dokumenterte refererer et «farmasøytisk akseptabelt salt» til et derivat av de offentliggjorte peptidene, der peptidet modifiseres ved å lage syre- eller basesalter av midlet. For eksempel fremstilles sure syresalter fra den frie basen (vanligvis der den nøytrale formen av legemidlet har en nøytral-NH₂-gruppe) som involverer reaksjon med en egnet syre. Egnede syrer for fremstilling

av syresalter inkluderer både organiske syrer, f.eks. eddiksyre, propionsyre, glykolsyre, pyrodruesyre, oksalsyre, eplesyre, malonsyre, ravsyre, maleinsyre, fumarsyre, vinsyre, sitronsyre, benzosyre syre, kanelisyre, mandelsyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, p-toluensulfonsyre, salicylsyre, og lignende, så vel som uorganiske syrer, f.eks. saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, salpetersyre, fosforsyre og lignende. Omvendt fremstilles preparatet av basiske salter av syregrupper som kan være til stede på et peptid ved anvendelse av en farmasøytisk akseptabel base, så som natriumhydroksid, kaliumhydroksid, ammoniumhydroksid, kalsiumhydroksid, trimmetylamin eller lignende.

I en spesielt foretrukket utførelsesform omfatter de farmasøytiske sammensetningene peptidene som salter av eddiksyre (acetater), ammonium eller saltsyre (klorider).

I en annen utførelsesform kan en farmasøytisk sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkludere sukkerarter, sukkeralkoholer, aminosyrer så som glycin, arginin, glutaminsyre og andre som rammeverksdanner. Sukkerne kan være mono-, di- eller trisakkarid. Disse sukkerartene kan anvendes alene, så vel som i kombinasjon med sukkeralkoholer. Eksempler på sukkere inkluderer glukose, mannose, galaktose, fruktose eller sorbose som monosakkarider, sakkarose, laktose, maltose eller trehalose som disakkarider og raffinose som et trisakkarid. En sukkeralkohol kan for eksempel være mannitose. Foretrukne bestanddeler er sakkarose, laktose, maltose, trehalose, mannit og/eller sorbitt, og mer foretrukket, mannitol.

Videre kan farmasøytiske sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkludere fysiologisk godt tolererte eksipienser (se Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5. utg., redigert av Raymond Rowe, Paul Sheskey and Sian Owen, Pharmaceutical Press (2006)), så som antioksidanter som askorbinsyre eller glutation, konserveringsmidler så som fenol, m-kresol, metyl- eller propylparaben, klorbutanol, tiomersal eller benzalkoniumklorid, stabilisator, rammeverksdanner så som sakkarose, laktose, maltose, trehalose, mannitose, mannit og/eller sorbitt, mannit og/eller laktose og løsningsmiddel så som polyetylenglykoler (PEG), dvs. PEG 3000, 3350, 4000 eller 6000, eller syklodekstriner, dvs. hydroksypropyl- β -syklodekstrin, sulfobutyletyl- β -syklodekstrin eller γ -syklodekstrin eller dekstraner eller poloksaomerer, dvs. poloksaomer 407, poloksamer 188 eller Tween 20, Tween 80. I en foretrukket

utførelsesform inkluderer farmasøytiske sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen en eller flere godt tolererte eksipienser, valgt fra gruppen bestående av antioksidanter, rammeverksdannere og stabilisator.

- 5 Det akseptable pH-området er pH 2 - 12 for intravenøs og intramuskulær administrering, men subkutant reduseres området til 2,7 - 9,0 ettersom raten av in vivo-fortynningen reduseres og gir et større potensiale for bestråling på injeksjonssetet. Strickley Robert G., Pharm. Res., 21, NO:2, 201 - 230 (2004).
- 10 Det farmasøytiske preparatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfattende peptider ifølge oppfinnelsen administreres til en pasient som lider av en adenomatøs eller cancerøs sykdom som er forbundet med det respektive peptidet eller antigenet. Ved å gjøre dette kan det trigges en T-celleformidlet immunrespons.
- 15 En farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen er foretrukket, der mengdene av (spesielt tumorassosierte) peptider ifølge oppfinnelsen som er til stede i sammensetningen er vev-, kreft- og/eller pasientspesifikk.
- 20 En nukleinsyrevaksine er beskrevet. Det er kjent at inokulering med en nukleinsyrevaksine, så som en DNA-vaksine, som koder for et polypeptid gir en T-cellerespons. Det kan administreres direkte til pasienten, inn i det påvirkede organet eller systemisk, eller påføres ex vivo til celler avledet fra pasienten eller en human cellelinje som deretter administreres til pasienten, eller anvendes in vitro for å velge en underpopulasjon fra immunceller avledet fra pasienten, som
- 25 deretter administreres på nytt til pasienten. Hvis nukleinsyren administreres til celler in vitro, kan det være nyttig for cellene som skal transfekteres, for å kouttrykke immunstimulerende cytokiner, som for eksempel interleukin-2 eller GM-CSF. Nukleinsyren(e) kan være i det vesentlige ren(e), eller kombineres med et immunstimulerende adjuvans, eller anvendes i kombinasjon med
- 30 immunstimulerende cytokiner, eller administreres sammen med et passende leveringssystem, for eksempel liposomer. Nukleinsyrevaksinen kan også administreres med en adjuvans, så som de som er beskrevet for peptidvaksiner ovenfor. Det er foretrukket hvis nukleinsyrevaksinen administreres uten adjuvans.
- 35 Polynukleotidet kan være i det vesentlige rent eller inneholdes i en egnet vektor eller leveringssystem. Egnede vektorer og leveringssystemer inkluderer de virale, så som systemer basert på adenovirus, vaccinia-virus, retrovirus,

herpesvirus, adenoassosiert virus eller hybrider som inneholder elementer av mer enn ett virus. Ikke-virale leveringssystemer inkluderer kationiske lipider og kationiske polymerer som er godt kjente i teknikken av DNA-levering. Fysisk levering, som for eksempel via en «genpistol», kan også anvendes. Peptidet eller peptid kodet av nukleinsyren kan være et fusjonsprotein, for eksempel med en epitop fra tetanustoksoid som stimulerer CD4-positive T-celler.

Enhver nukleinsyre som administreres til pasienten er hensiktsmessig steril og pyrogenfri. Nakent DNA kan gis intramuskulært eller intradermalt eller subkutant. Nukleinsyren kan hensiktsmessig omfatte enhver egnet nukleinsyreliveringsanordning. Nukleinsyren, fortrinnsvis DNA, kan også leveres i et liposom eller som del av et viralt vektorleveringssystem. Det er foretrukket hvis nukleinsyrevaksinen, så som DNA-vaksine, administreres inn i muskelen, samtidig som peptidvaksinene fortrinnsvis administreres s.c. eller i.d. Det er også foretrukket hvis vaksinen administreres inn i huden.

Det antas at opptaket av nukleinsyren og uttrykkingen av det kodede polypeptidet ved profesjonelle antigenpresenterende celler, så som dendrittceller kan være mekanismen for priming av immunresponsen; dendrittceller kan imidlertid ikke transfekteres, men er fortsatt viktige siden de kan plukke opp uttrykt peptid fra transfekterte celler i vevet (f.eks. «kryss-priming», Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen YC, Huang LQ, Laheru DA, Goggins M, Hruban RH, Jaffee EM. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. J Exp Med. 2004 Aug 2; 200(3):297-306).

Polynukleotidformidlet immuniseringsterapi av kreft er beskrevet i Conry et al (1996) Seminars in Oncology 23, 135-147; Condon et al (1996) Nature Medicine 2, 1122-1127; Gong et al (1997) Nature Medicine 3, 558-561; Zhai et al (1996) J. Immunol. 156, 700-710; Graham et al (1996) Int J. Cancer 65, 664-670; og Burchell et al (1996) 309-313 In: Breast Cancer, Advances in biology and therapeutics, Calvo et al (red.), John Libbey Eurotext, som alle innføres i dette dokumentet ved referanse i sin helhet.

Det kan også være nyttig til å målrette vaksinen til spesifikke cellepopulasjoner, for eksempel antigenpresenterende celler, enten ved injeksjonssetet, ved anvendelse av målrettingsvektorer og leveringssystemer, eller selektiv rensing

av en slik cellepopulasjon fra pasienten og ex vivo-administrering av peptidet eller nukleinsyren (f.eks. kan dendrittceller sorteres som beskrevet i Zhou et al (1995) Blood 86, 3295-3301; Roth et al (1996) Scand. J. Immunology 43, 646-651). For eksempel kan målrettingsvektorer omfatte en vev- eller tumorspesifikk promotor som dirigerer uttrykkningen av antigenet ved et egnet sted.

Til slutt kan vaksinen ifølge oppfinnelsen avhenge av den spesifikke krefttypen som pasienten som skal behandles lider av samt status for sykdommen, tidligere behandlingsregimer, immunstatusen til pasienten, og, selvfølgelig, HLA-haplotypen til pasienten. Dessuten kan vaksinen ifølge oppfinnelsen inneholde individuelle komponenter, ifølge personlige behov til den bestemte pasienten. Eksempler er forskjellige mengder av peptider ifølge uttrykkningen av de relaterte TAA-ene hos den bestemte pasienten, uønskede bivirkninger på grunn av personlige allergier eller andre behandlinger, og justeringer for sekundære behandlinger etter en første runde eller behandlingsplan.

I tillegg til å være nyttige for behandling av kreft, beskrives peptidene ifølge den foreliggende oppfinnelsen som diagnostikk. Ettersom peptidene ble generert fra glioblastom og siden det ble bestemt at disse peptidene ikke er til stede i normale vev, kan disse peptidene anvendes til å diagnostisere nærværet av en kreftform.

Nærværet av peptidene på vevsbiopsier kan hjelpe en patolog i diagnostisering av kreften. Detektering av visse peptider ved hjelp av antistoffer, massespektrometri eller andre fremgangsmåter som er kjent innen teknikken kan fortelle patologen at vevet er malignt eller betent eller generelt sykt. Et nærvær av grupper av peptider kan muliggjøre klassifisering eller underklassifisering av sykt vev.

Detekteringen av peptidene på en syk vevsprøve kan muliggjøre beslutningen om fordelene ved terapier som involverer immunsystemet, spesielt hvis T-lymfocytter er kjent for eller ventes å involveres i virkningsmekanismen. Tap av MHC-uttrykkningen er en godt beskrevet mekanisme som fører til at infiserte celler eller kreftceller unnslipper immunovervåkning. Dermed viser nærværet av peptidene at denne mekanismen ikke utnyttes av de analyserte cellene.

Peptidene kan anvendes til å analysere lymfocytteresponser mot slike peptider, så som T-celleresponser eller antistoffresponser mot peptidene eller peptidene kompleksert til MHC-molekyler. Disse lymfocytteresponsene kan anvendes som

prognostiske markører for vedtak om ytterligere terapitriinn. Disse responsene kan også anvendes som surrogatmarkører i immunterapitilnærminger som tar sikte på å indusere lymfocytteresponser på forskjellige måter, f.eks. vaksinasjon av protein, nukleinsyrer, autologe materialer, adoptiv overføring av lymfocytter. I genterapisetninger kan lymfocytteresponser mot peptidene ifølge den foreliggende oppfinnelsen tas i betraktning ved vurderingen av bivirkninger. Overvåking av lymfocytteresponser kan også være et verdifullt verktøy for oppfølgende undersøkelser av transplantasjonsterapier, f.eks. for detekteringen av transplantat-mot-vert- og vert-mot-transplantat-sykdommer.

Det er beskrevet et sett omfattende (a) en beholder som inneholder en farmasøytisk sammensetning som beskrevet ovenfor, i løsning eller i lyofilisert form; (b) eventuelt en andre beholder som inneholder et fortynningsmiddel eller rekonstituering av løsningen for den lyofiliserte formuleringen; og (c) eventuelt, instruksjoner for (i) anvendelse av løsningen eller (ii) rekonstituering og/eller anvendelse av den lyofiliserte formuleringen. Settet kan videre omfatte en eller flere av (iii) en buffer, (iv) et fortynningsmiddel, (v) et filter, (vi) en nål, eller (v) en sprøyte. Beholderen er fortrinnsvis en flaske, en ampulle, en sprøyte eller prøverør; og den kan være en flerbruksbeholder. Den farmasøytiske sammensetningen er fortrinnsvis lyofilisert.

Sett omfatter fortrinnsvis en lyofilisert formulering ifølge den foreliggende oppfinnelsen i en egnet beholder og instruksjoner for sin rekonstituering og/eller anvendelse. Egnede beholdere inkluderer for eksempel flasker, ampuller (f.eks. ampuller med to kammer), sprøyter (for eksempel sprøyter med to kammer) og prøverør. Beholderen kan dannes fra en rekke forskjellige materialer så som glass eller plast. Fortrinnsvis inneholder settet og/eller beholderen instruksjoner om eller tilknyttet beholderen som indikerer retninger for rekonstituering og/eller anvendelse. For eksempel kan etiketten indikere at den lyofiliserte formuleringen skal rekonstitueres til peptidkonsentrasjoner som beskrevet ovenfor. Etiketten kan videre indikere at formuleringen er nyttig eller ment for subkutan administrering.

Beholderen som holder formuleringen kan være en flerbruksampulle, som gir mulighet for gjentatte administreringer (f.eks. fra 2-6 administreringer) for den rekonstituerte formuleringen. Settet kan videre omfatte en andre beholder omfattende et egnet fortynningsmiddel (f.eks. natriumbikarbonatløsning).

Ved blanding av fortynningsmidlet og den lyofiliserte formuleringen er den endelige peptidkonsentrasjonen i den rekonstituerte formuleringen fortrinnsvis minst 0,15 mg/ml/peptid (= 75 µg) og fortrinnsvis ikke mer enn 3 mg/ml/peptid (= 1 500 µg). Settet kan videre inkludere andre materialer ønskelig fra et kommersielt synspunkt og brukersynspunkt, inklusive andre buffere, fortynningsmidler, filtere, kanyler, sprøyter, og pakkeinnlegget med instruksjoner for bruk.

Settene kan ha en enkelt beholder som inneholder formuleringen av de farmasøytiske sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen med eller uten andre komponenter (f.eks. andre forbindelser eller farmasøytiske sammensetninger av disse andre forbindelsene) eller kan ha en distinkt beholder for hvert komponent.

Sett inkluderer fortrinnsvis en formulering ifølge oppfinnelsen pakket for anvendelse i kombinasjon med ko-administreringen av en andre forbindelse (så som adjuvanter (f.eks. GM-CSF), et kjemoterapeutisk middel, et naturprodukt, et hormon eller antagonist, et anti-angiogenesemiddel eller hemmer, et apoptoseinduserende middel eller en chelator) eller en farmasøytisk sammensetning av disse. Komponentene i settet kan forhåndskompleksdannes eller hver komponent kan være i en separat distinkt beholder før administrering til en pasient. Komponentene i settet kan tilveiebringes i en eller flere flytende løsninger, fortrinnsvis, en vandig løsning, mer foretrukket, en steril vandig løsning. Komponentene i settet kan også tilveiebringes som faststoffer, som kan omdannes til væsker ved tilsetning av egnede løsningsmidler, som fortrinnsvis tilveiebringes i en annen distinkt beholder.

Beholderen av et terapeutisk sett kan være en ampulle, reagensrør, kolbe, flaske, sprøyte eller på annen måte omslutte et faststoff eller væske. Vanligvis, når det er mer enn en komponent, vil settet inneholde en andre ampulle eller annen beholder, som muliggjør separat dosering. Settet kan også inneholde en annen beholder for en farmasøytisk akseptabel væske. Fortrinnsvis vil et terapeutisk sett inneholde en anordning (f.eks. en eller flere nåler, sprøyter, øyedryppere, pipette osv.), som muliggjør administrering av midlene ifølge oppfinnelsen, som er komponenter av det foreliggende settet.

Den farmasøytiske formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen er en som er egnet for administrering av peptidene ved hvilken som helst akseptabel vei som for eksempel oralt (enteral), nasalt, oftalt, subkutan, intradermalt,

intramuskulært, intravenøst eller transdermalt. Fortrinnsvis er administreringen s.c., og mest foretrukket i.d. Administreringen kan være ved infusjonspumpe.

5 Oppfinnelsen vil nå bli beskrevet i nærmere detalj ved henvisning til de følgende figurene, sekvenslisten og eksemplene. De følgende eksemplene tilveiebringes kun for illustrerende formål og er ikke ment å begrense oppfinnelsen.

Kort beskrivelse av figurene

10 Figur 1: Tetrameranalyse av mikrosfæredrevet proliferasjon av CSP-001- og NLGN4X-001-spesifikke CD8-positive lymfocytter fra perifert blod fra en frisk donor. 1×10^6 CD8-positive berikede PBMC-er per brønn ble stimulert ukentlig med mikrosfærer koplet til anti-CD28 pluss høytetthetstumorantigen A*0201/CSP-001 (venstre panel) eller anti-CD28 pluss høytetthetstumorantigen A*0201/NLGN4X-001 (høyre panel). Etter tre stimuleringer in vitro ble alle cellene farget med antistoff CD8 FITC, og fluoresceinmerkede tetramerer A*0201/ CSP-001 og A*0201/ NLGN4X-001. Cellene sorteres på CD8-positive lymfocytter; tallene representerer prosentandelen av celler i den indikerte kvadranten mellom CD8-positive lymfocytter.

20 Figur 2: Affinitet av peptider av HLA-klasse I ifølge oppfinnelsen til MHC-molekylet kodet av HLA-A*0201-allelet. Dissosiasjonskonstantene (K_D) av TUMAP-er av IMA950 HLA-klasse I, kontrollpeptidene IMA-MUC-001 (mellomliggende bindemiddel) og viralmarkørpeptidet HBV-001 (sterk bindemiddel) ble målt med en ELISA-basert MHC-omfoldingsanalyse. Analysen ble gjentatt tre ganger med lignende resultater.

25 Figur 3: Relativ in vitro-binding av IMA-BIR-002 og IMA-MET-005 avledet 15-merer til de hyppigste HLA-DR-allelene. Den ProImmune REVEAL™-teknologien benytter in vitro HLA-DR-sammenstillingsanalyser for å fastslå assosiasjonshastighetene for MHC-en: peptidkomplekset er i høy grad bestemmende for bindingskonstanten til individuelle peptider. Analysen ble utført ved ProImmune (Oxford, UK). På et fastsatt tidspunkt ble mengden av intakte MHC:peptidkomplekser målt og sammenlignet med mengden for en bestått/ikke-bestått kontroll (relativt svakt bindemiddel). Et sterkt, promiskuøst HLA-DR-bindemiddel inngår som positiv kontroll. Verdien indikerer mengden binding for de individuelle peptidene og HLA-DR-molekylene i forhold til bestått/ikke bestått-kontrollen. Ettersom REVEAL™-teknologien begrenses til 15-merer, ble to overlappende 15-merer (posisjon 2-16; 30 6-20) testet i stedet for full-lengde MET-005.

Figurene 4a og 4b viser nærværet av PSMA- og Survivin-spesifikke IFN γ -utskillende CD4-positive T-celler i perifere blodmononukleære celler (PBMC) fra forskjellige tidspunkter av en vaksinert pasient som ble bestemt ved hjelp av en IFN γ -EliSpot. Tidspunkter: forhåndsvaksinering (a) og etter 3.(b), 6.(c), 7.(d), 8.(e), 9.(f), 10.(g), 11.(h) vaksinasjon.

Figur 5 viser nærværet av Survivin-spesifikke IFN γ -, IL-5, IL-10, TNF α -utskillende CD4-positive T-celler i PBMC fra tre forskjellige tidspunkter av en vaksinert pasient som ble bestemt via den intracellulære fargingsanalysen (ICS). Tidspunkter: etter 1.(a), 3.(b), 7.(c), vaksinasjon.

Eksempler

1. Syntese

Peptidene ble syntetisert ved hjelp av standard og godt etablert fastfasesyntese ved anvendelse av Fmoc-kjemi. Etter rensing ved preparativ HPLC ble ionebytterprosedyren utført for å innføre fysiologisk compatible motioner (for eksempel acetat, ammonium eller klorid). Til slutt ble hvite til off-white faststoffer oppnådd etter lyofilisering. Alle TUMAP-ene administreres fortrinnsvis som acetatsalter, andre saltformer er også mulige.

Det er viktig at identiteten og renheten av peptidene kan bestemmes enkelt og med stor nøyaktighet ved hjelp av massespektrometri, aminosyreanalyse og analytisk HPLC. Ifølge de analytiske resultatene viser alle peptidene som anvendes for IMA950-vaksinen den korrekte strukturen med renheter $\geq 95\%$.

Tabell 5: Fysiko-kjemiske egenskaper av peptider i IMA950

Nr.	Peptid-ID	Peptidlengde (nr. amino- syrer)	Saltform	Fysisk form	Hygroskopisitet
1	CSP-001	9	acetat	Hvitt til off- white lyofilisat	Lagret som lyofilisert pulver. Lyofiliserte peptider har det vanligvis.
2	FABP7-001	9	acetat		
3	NLGN4X-001	9	acetat		
4	TNC-001	9	acetat		

Nr.	Peptid-ID	Peptidlengde (nr. amino- syrrer)	Saltform	Fysisk form	Hygroskopisitet
5	NRCAM-001	9	acetat		
6	IGF2BP3-001	9	acetat		Hygroskopiske egenskaper
7	BCA-002	9	acetat		
8	MET-005	17	acetat		
9	PTP-003	9	acetat/ ammonium		
10	PTP-005	9	acetat		
11	CHI-001	9	acetat		
12	BIR-002	15	acetat		
13	(HBV-001)	10	acetat		

2. Komponenter av den eksempelvisse farmasøytiske sammensetningen IMA950

5 IMA950 settes sammen av en cocktail av syntetiske tumorassosierte peptider (TUMAP-er) hvorav de fleste har blitt identifisert på primære kolorektale kreftceller. TUMAP-ene inkluderer 10 bindingspeptider av HLA-klasse I med evnen til å aktivere cytotoksiske T-celler (CD8-positive T-celler), 1 bindingspeptid av HLA-klasse II med evne til å aktivere T-hjelperceller (CD4-positive T-celler), og 1

10 langstrakt bindingspeptid av HLA-klasse 1 med begge kapasitetene. T-hjelperceller spiller en avgjørende rolle i å behjelp funksjonen av cytotoksiske T-celler ved å frigjøre cytokiner som øker dreperfunksjonen av CD8-positive T-celler og kan også virke direkte mot tumorceller (Knutson and Disis, 2005). I tillegg til disse 12 TUMAP-ene inneholder IMA950 et viruskontrollpeptid.

15

Prøver fra kirurgisk fjernede maligne og normale vev fra GBM-pasienter, og blod fra friske donorer ble analysert på en trinnvis tilnærming:

20

Først ble genombred mRNA-uttrykkingsanalyse av mikromatriser anvendt til å identifisere gener overuttrykt i det maligne vevet sammenlignet med en rekke

normale organer og vev. I et andre trinn ble HLA-ligander fra det maligne materialet identifisert ved massespektrometri. Deretter ble identifiserte HLA-ligander sammenlignet med genuttrykkingsdataene. Peptider kodet av selektivt uttrykte eller overuttrykte gener som detektert i trinn 1 ble ansett som egnede kandidat-TUMAP-er for en vaksine med flere peptider.

Et litteratursøk ble utført for å identifisere ytterligere bevis som støtter relevansen av de identifiserte peptidene som TUMAP-er.

Til slutt ble perifere CD8-positive T-celler fra friske individer testet for reaktivitet mot de tumorassosierte HLA-ligandene ved hjelp av flere immunanalyser (T-celleanalyser in vitro).

Tabell 3: IMA950 TUMAP-sammensetning

IMA950 inneholder 10 HLA-A*02-bindende peptider (klasse I), 1 HLA-DR-bindingspeptid (klasse II), og 1 langstrakt HLA-A*02-peptid. I tillegg vil virusmarkørpeptidet HBV-001 inkluderes som ikke er oppført her.

Tabell 6: Funksjoner av proteinene, TUMAP-ene avledes fra

TUMAP ID	Navn	Funksjon / Kommentarer
HLA-A*02 TUMAP-er		
BCA-002	Brevican	Hjernespesifikt ECM-molekyl involvert i invasjon; overuttrykt og spesifikt deglykosylert i gliom; stamcellenisjeforbundet.
CHI-001	Kitinase 3-lignende 2	Ekstracellulært protein med uklar funksjon; høyt overuttrykt i glioblastom.
CSP-001	Kondroitinsulfatproteoglykan 4	Transmembrant proteoglykan, rolle i neovaskularisering; overuttrykt av tumorceller og pericytter på blodkarene av maligne hjernetumorer.

TUMAP ID	Navn	Funksjon / Kommentarer
HLA-A*02 TUMAP-er		
FABP7-001	Fettsyrebindende protein 7, hjerne	Cytoplasmisk protein involvert i fettsyremetabolisme; forbundet med økt bevegelse av GBM-celler i omgivende vev og med kort overlevelse; høyt overuttrykt i GBM.
IGF2BP3-001	Insulinlignende vekstfaktor-2-mRNA-bindingsprotein 3	Funksjon i mRNA-omsetning og translasjonell kontroll; onkoføtalt protein; beskrevet som overuttrykt i mange kreftformer der det er forbundet med dårlig overlevelse.
NLGN4X-001	Neuroligin 4, X-bundet	Celleadhesjonsmolekyl; lite litteratur; svært immunogent; høy overuttrykking i GBM og GIST; rolle i invasjon og tumorigenese.
NRCAM-001	Nevronalt celleadhesjonsmolekyl	Involvert i betakateninsignalreaksjonsveien; viktig rolle i invasjon, tumorvekst og tumorigenese; høye uttrykkningsnivåer korreleres til dårlig overlevelse.
PTP-003 PTP-005	Proteintyrosinfosfatase, reseptortype, Z-polypeptid 1	Transmembranprotein av type I; svært overuttrykt i glioblastom, oligodendrogliom og andre tumorer; funksjonell rolle i tumorigenese; genamplifisering oppstår ofte i GBM og andre tumorenheter.
TNC-001	Tenascin C	Rolle i angiogenese; sentral aktør i flere reaksjonsveier involvert i tumortransformasjon og proliferasjon; overuttrykt i tumorleverende blodkar; kreftstamcellenisje forbundet.
HLA-DR TUMAP		

TUMAP ID	Navn	Funksjon / Kommentarer
HLA-A*02 TUMAP-er		
BIR-002	Survivin	Tumorooverlevelsesantigen involvert i regulering av apoptose og proliferasjon; overuttrykking i gliomer og andre tumorentiteter korrelerer med dårlig prognose.
langstrakt HLA-A*02 TUMAP		
MET-005	Met proto-onkogen	Hepatocyttevekstfaktorreseptor; involvert i malign transformasjon, invasivitet og angiogenese; rapportert som GBM-stamcelleforbundet.

3. Presentasjon av tumorassosierte peptider (TUMAP-er) inneholdt i IMA950 på tumorprøver.

5 Vevsprøver

Pasienters tumorvev ble tilveiebrakt av Hôpital Cantonal Universitaire de Genève (Medical Oncology Laboratory of Tumor Immunology) og Neurochirurgische Universitäts-Klinik Heidelberg (Molekularbiologisches Labor). Skriftlig informert samtykke fra alle pasientene hadde blitt gitt før operasjonen. Vevene ble sjokkfrosset i flytende nitrogen umiddelbart etter kirurgi og lagret inntil isolering av TUMAP-er ved -80 °C.

Isolering av HLA-peptider fra vevsprøver

HLA-peptidsammenslåinger fra sjokkfrosne vevsprøver ble oppnådd ved immunutfelling fra faste vev ifølge en noe modifisert protokoll (Falk, K. et al 1991; Seeger, F.H. et al. T 1999) ved hjelp av det HLA-A*02-spesifikke antistoffet BB7.2 eller det HLA-A, -B, -C-spesifikke antistoffet W6/32, CNBr-aktivert sefarose, syrebehandling og ultrafiltrering.

Detektering av TUMAP-er ved ESI-væskechromatografi-massespektrometri (ESI-LCMS)

Fremgangsmåte en:

De oppnådde HLA-peptidsammenslåingene ble separert ifølge deres hydrofobisitet ved reversfasekromatografi (CapLC, Waters), og de eluerte peptidene ble analysert i et «hybrid quadrupole orthogonal acceleration time of flight tandem mass spectrometer» (Q-TOF Ultima, Waters) utstyrt med en ESI-kilde. Peptidsammenslåingene ble lastet opp på en C18 pre-kolonne for konsentrasjon og avsalting. Etter lasting ble førkolonnen plassert i kø for separering av en smeltet silisiumdioksidmikrokapillærkolonne (75 µm i.d. x 250 mm) pakket med 5 µm C18-reversfasemateriale (Dionex). Løsningsmiddel A var 4 mM ammoniumacetat/vann. Løsningsmiddel B var 2 mM ammoniumacetat i 80 % acetonitril/vann. Begge løsningsmidlene ble justert til pH 3,0 med maursyre. En binær gradient av 15 til 60 % B i løpet av 90 minutter ble utført, ved å anvende en strømningshastighet på 5 µl/min redusert til ca. 200 nl/min av et splittsystem. En gullbelagt glasskapillar (PicoTip, New Objective) ble anvendt for innføring i mikro-ESI-kilden. Integreringstiden for TOF-analysatoren var 1,9 s med en interscanforsinkelse på 0,1 s. Deretter ble peptidsekvensene avdekket av kollisjonalt industert nedbrytnings-(CID)-massespektrometri (ESI-LCMS/MS). Den identifiserte TUMAP-sekvensen ble sikret ved sammenligning av det genererte naturlige TUMAP-fragmenteringsmønsteret med fragmenteringsmønsteret til et syntetisk sekvensidentisk referansepeptid.

Fremgangsmåte to:

De oppnådde HLA-peptidsammenslåingene ble separert ifølge deres hydrofobisitet ved reversfasekromatografi (Acquity UPLC-system, Waters), og de eluerte peptidene ble analysert i et LTQ-Orbitrap-hybridmassespektrometer (ThermoElectron) utstyrt med en ESI-kilde. Peptidsammenslåingene ble fylt direkte på den analytiske fuserte silisiumdioksidmikrokapillærkolonnen (75 µm i.d. x 250 mm) pakket med 1,7 µm C18-reversmateriale (Waters) ved å påføre en strømningshastighet på 400 nl per minutt. Deretter ble peptidene separert ved hjelp av en to-trinns 180 minutters binær gradient fra 10 til 33 % B ved strømningshastigheter på 300 nl per minutt. Gradienten bestod av løsningsmiddel A (0,1 % maursyre i vann) og løsningsmiddel B (0,1 % maursyre i acetonitril). En gullbelagt glasskapillar (PicoTip, New Objective) ble anvendt for innføring i mikro-ESI-kilden. LTQ-Orbitrap-massespektrometeret ble operert i den dataavhengige

modusen ved hjelp av en TOP5-strategi. I korte trekk ble en skanningsyklus innledet med en full skann av høy massenøyaktighet i orbitrapen ($R = 30\,000$), som ble fulgt av MS/MS-skanninger også i orbitrapen ($R = 7\,500$) på de 5 mest hyppige forløperionene med dynamisk utelukkelse av tidligere utvalgte ioner. Tandemmassespektrene ble tolket av SEQUEST og ekstra manuell kontroll. Den identifiserte TUMAP-sekvensen ble sikret ved å sammenligne det genererte naturlige TUMAP-fragmenteringsmønsteret med fragmenteringsmønsteret av et syntetisk sekvensidentisk referansepeptid. Fig. 1a og b viser eksemplariske spektre oppnådd fra tumorvev for assosierte TUMAP-er av MHC-klasse I.

Tabell 7 viser resultatene av en analyse av glioblastomprøver, de fleste fra primære GBM-tumorer. Alle HLA-A*02-TUMAP-ene ble funnet på tre eller flere av den 18 analyserte prøven og 5 av TUMAP-ene ble detektert i mer enn 50 % av de analyserte GBM-prøvene.

Tabell 7: Detektering av TUMAP-er av klasse I i GBM-prøver

Bare tumorprøver analysert for ligander av klasse I ble inkludert («-» = TUMAP av IMA950-klasse I ikke detektert; «+» = TUMAP av IMA950-klasse I detektert)

Nr.	GBM-prøve	Tumorstadium (grad)	TUMAP av klasse I detektert (+) eller ikke detektert (-) i massespektrometrisk analyse									
			IMA-BCA-002	IMA-CHI-001	IMA-CSP-001	IMA-FABP7-001	IMA-IGF2BP3-001	IMA-NLGN4X-001	IMA-NRCAM-001	IMA-PTP-003	IMA-PTP-005	IMA-TNC-001
1	GB6010T	primær GBM (IV)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	GB1023T	primær GBM (IV)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	GB1021T	primær GBM (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
4	GB6003T ^d	primær GBM (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
5	GB1020T	primær GBM (IV)	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
6	GB6027T	primær GBM (IV)	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
7	GB1014T ^d	sekundær GBM (IV)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
8	GB1012T	primær GBM (IV)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
9	GB6019T	primær GBM (IV)	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
10	GB1002T	primær GBM (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
11	GB6024T	primær GBM (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
12	GB1006T	primær GBM (IV)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
13	GB1004T	primær GBM (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
14	GB1008T	primær GBM (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
15	GB1011T	primær GBM (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
16	GB1005T	primær GBM (IV)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
17	GB6015T	primær GBM (IV)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
18	GB6016T	primær GBM (IV)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+

4. In vitro-immunogenisitet for I-presenterte peptider av IMA950 MHC-klasse I

5

For å få informasjon om immunogenisiteten av peptider som inngår i IMA950, utførte vi undersøkelser ved hjelp av en godt etablert in vitro-stimuleringsplattform allerede beskrevet av (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978). På denne måten kunne vi vise positive immunogenisitetsdata for 10/10 testede HLA-A*0201-begrensede peptider inneholdt i IMA950 som viser at disse peptidene er T-celle epitoper mot der CD8-positive T-forløperceller eksisterer hos mennesker. Immunogenisiteten til MET-005 kunne ikke testes av denne fremgangsmåten ettersom den ikke binder i den langstrakte formen til HLA-A*02. Derfor kunne ikke tetramerer med MET-005 produseres, som er uunnværlig for in vitro-stimuleringen. Men for den inkluderte HLA-A*02-epitopen MET-001 (YVDPVITSI, se EP 1507795B1) ble in vitro-immunogenisiteten vist. MET-005 er ment å stimulere MET-001-spesifikke CTL-

20

er etter hensiktsmessig og naturlig forekommende behandling av APC-er. Immunogenisiteten av MET-001 indikerer nærværet av MET-001-spesifikke CTL-er hos friske donorer som også er en forutsetning for effektiviteten av MET-005 som en del av en kreftvaksine. Derfor er immunogenisiteten av MET-001 en sterk indikator for immunogenisiteten av MET-005.

In vitro-priming av CD8-positive T-celler

For å utføre in vitro-stimuleringer av kunstige antigenpresenterende celler (AAPC) lastet med peptid-MHC-kompleks (pMHC) og anti-CD28-antistoff, isolerte vi først PBMC-er (mononukleære celler fra perifert blod) fra ferske HLA-A*02 + brungul hinne ved hjelp av standard tetthetsgradientseparasjonsmedium (PAA, Cölbe, Tyskland). De brungule hinnene ble enten oppnådd fra Blodbanken Tübingen eller fra Katharinenhospital Stuttgart. De isolerte PBMC-ene ble inkubert over natten i T-cellemedium (TCM) for human in vitro-priming som bestod av RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Tyskland) supplert med 10 % varmeinaktivert humant AB-serum (PAA, Cölbe, Tyskland), 100 U/ml penicillin / 100 µg/ml streptomycin (Cambrex, Verviers, Belgia), 1 mM natriumpyruvat (CC Pro, Neustadt, Tyskland) og 20 µg/ml gentamycin (Cambrex). CD8-positive lymfocytter ble isolert ved hjelp av det CD8-positive MACS-positive seleksjonssettet (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Tyskland) ifølge produsentens instruksjoner. De oppnådde CD8-positive T-cellene ble inkubert inntil anvendelse i TCM supplert med 2,5 ng/ml IL-7 (PromoCell, Heidelberg, Tyskland) og 10 U/ml IL-2 (Chiron, Munchen, Tyskland). Generering av pMHC/anti-CD28-belagte perler, T-cellestimuleringer og avlesning ble utført som beskrevet tidligere (Walter et al., 2003) med mindre modifikasjoner. Kort fortalt ble biotinyllert rekombinante HLA-A*0201-molekyler som manglet transmembrandomenet og biotinyllert ved karboksyenden til den tunge kjeden fremstilt etter en fremgangsmåte beskrevet av (Altman et al., 1996). Det rensede kostimulerende muse-IgG2a-anti-humane CD28 Ab 9.3 (Jung et al., 1987) ble kjemisk biotinyllert ved hjelp av Sulfo-N-hydroksysuksinimidobiotin som anbefalt av produsenten (Perbio, Bonn, Tyskland). Kulene som ble anvendt var 5,60 µm store streptavidinbelagte polystyrenpartikler (Bangs Laboratories, Illinois/USA). pMHC anvendt som positive og negative kontroller var henholdsvis A*0201/MLA-001 (peptidet ELAGIGILTV fra modifisert Melan-A/MART-1) og A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI fra DDX5) eller A*0201/HBV-001 (FLPSDFFPVS).

800 000 kuler/200 µl ble belagt i 96-brønners plater i nærvær av 600 ng biotin anti-CD28 pluss 200 ng relevant biotin-pMHC (høytetthetsperler) eller 2 ng relevant pluss 200 ng irrelevant (pMHC-bibliotek) MHC (lavtetthetskuler). Stimuleringene ble innledet i 96-brønners plater ved å koinkubere 1×10^6 CD8-positive T-celler med 2×10^5 vaskede belagte kuler i 200 µl TCM supplert med 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) i 3-4 dager ved 37 °C. Halvparten av mediet ble deretter byttet ut med frisk TCM supplert med 80 U/ml IL-2, og inkuberingen ble fortsatt i 3-4 dager ved 37 °C. Denne stimuleringssyklusen ble utført totalt tre ganger. Til slutt ble tetramere analyser utført med fluorescerende MHC-tetramerer (fremstilt som beskrevet av (Altman et al., 1996) pluss antistoff CD8-FITC-klon SK1 (BD, Heidelberg, Tyskland) i et firefarget FACSCalibur (BD). De peptidspesifikke cellene ble beregnet som andel av totale CD8-positive T-celler. Evaluering av tetramerisk analyse ble gjort ved hjelp av programvaren FCS Express (De Novo-programvare). In vitro-priming av spesifikke tetramerpositive CD8-positive lymfocytter ble detektert av passende portsortering og ved å sammenligne med negative kontrollstimuleringer. Immunogenisiteten for et gitt antigen ble detektert dersom minst en evaluert in vitro-stimulert brønn av en frisk donor ble funnet å inneholde en spesifikk CD8-positiv T-cellelinje etter in vitro-stimulering (dvs. at denne brønnen inneholdt minst 1 % spesifikk tetramerpositiv blant de CD8-positive T-cellene og andelen av de spesifikke tetramerpositive cellene var minst 10x gjennomsnittet for de negative kontrollstimuleringene).

In vitro-immunogenisitet for IMA950-peptider

For testede peptider av HLA-klasse I kunne in vitro-immunogeniteten detekteres ved generering av peptidspesifikke T-cellelinjer. En representativ farging som viser genereringen av T-cellelinjer som er spesifikke for, er vist i figur 1. Resultatene er oppsummert i tabell 8.

Tabell 8: Immunogenisiteten til peptider av HLA-klasse I inkludert i IMA950

Antigen	Positive donorer / donorer testet	Positive brønner / brønner testet
BCA-002	75 %	35 %
CHI-001	100 %	63 %

Antigen	Positive donorer / donorer testet	Positive brønner / brønner testet
CSP-001	100 %	57 %
FABP7-001	100 %	27 %
IGF2BP3-001	50 %	21 %
NLGN4X-001	100 %	62 %
NRCAM-001	86 %	39 %
PTP-003	50 %	17 %
PTP-005	100 %	52 %
TNC-001	60 %	30 %
MET-001 (MET-005)	67 %	39 %
HBV-001	43 %	12 %

5 Resultatene av in vitro-immunogenisitetstestene utført av Immatics for alle peptidene av HLA-klasse I inkludert i IMA950 er oppsummert her. Resultatene som vises er blitt oppnådd ved stimulering av CD8-positive celler med kuler av høy tetthet. Ettersom forskjellige humane serummasser kan sterkt påvirke immunogenisitetresultatene, ble bare analyser der en og den samme serummassen ble anvendt, evaluert sammen.

5. Immunogenisiteten av IMA950-klasse II TUMAP BIR-002

10

En klinisk studie ble utført for å bekrefte immunogenisiteten til peptidet med SEQ ID NO:12.

15

Det primære studieformålet var etterforskningen av den PSA (prostata-spesifikke antigen)-baserte responsen (PSA-R) til den subkutane administreringen av et prostata-spesifikt peptidpanel (vaksinasjonsterapi) hos pasienter med biokjemisk tilbakefall etter radikal prostataektomi uten detektering av manifeste metastatiske lesjoner.

Det sekundære studieformålet var etterforskningen av toleransen og muligheten for å administrere vaksinasjonsterapi hos pasienter med prostatakarsinom med særskilt vurdering av immunologiske fenomener i form av en T-cellerespons.

- 5 Studien ble utformet som en prospektiv, randomisert fase I/II-studie for indikasjonen av «biokjemisk tilbakefall etter radikal prostataektomi uten detektering av manifeste metastastiske lesjoner.»

Studiepopulasjon

10

Som en del av denne fase I/II-studien ble det gjort et forsøk på å indusere PSA-regresjon som en indikator på opphør av tumorvekst ved hjelp av vaksinasjon med et prostataspesifikt peptidpanel hos HLA-A*02-positive pasienter med biokjemisk tilbakefall etter radikal prostataektomi. En kombinasjon av prostataspesifikke peptider ble administrert subkutant med vurdering av omfanget av den respektive immunresponsen i forbindelse med forskjellige administreringsformer for de antigene strukturene.

15

I motsetning til tidligere vaksinasjonsstudier rettet den planlagte studien seg mot behandlingen av pasienter med en liten tumorbyrde som ennå ikke kunne detekteres av billeddiagnostikkprosedyrer. Alle pasientene ble immunisert på samme måte ved anvendelse av kjente prostataspesifikke antigene strukturer for å øke immunresponsen til de maligne transformerte cellene. Nitten pasienter ble behandlet.

20

25

Tabell 9: Karakteristikk av studiepopulasjon

	Totalt	%	Gjennomsnitt	Område
Alder	19		63	55 - 77
Før neo- / adjuvansbehandling				
Ingen	11	58		
Stråling	3	16		
Intermittent Hormonellterapi	2	11		
Str. + Int. horm. behandling	2	11		
Str. + kjemoterapi	1	5		

TNM ved RPX				
T2a-c R0	6	32		
T3a-c R0	6	32		
T2a-c R1	3	16		
T3a-c R1	3	16		
T3aN2 R0	1	5		
Gleason-resultat				
5-7	10	53		
8-10	3	16		
unknown	6	32		
RPX før vaksinasjon i måneder			41	9 - 124
Første tilbakefall etter OP i måneder			14	1 - 90
PSA ved vaksinasjonsstart			0,76	0,14 – 10,8

Behandlingsplan

5 Etter utelukking av manifeste metastatiske ved hjelp av computertomografi og skjelettscintigrafi ble en prostataspesifikk peptidvaksine subkutant administrert ifølge de forskjellige administreringsformene for pasienter med detektert PSA-tilbakefall etter tidligere radikal prostataektomi (PSA-økning i form av en 50 % forhøyet verdi i løpet av to målinger med minst 14 dagers mellomrom). Vaksinen ble administrert 8 x på dagene 0, 7, 14, 28, 42 og 56 (omtrent 100 mikrogram per peptid og injisert hver gang). Etter hver vaksinasjonsbehandling og igjen på 10 dag 70, ble PSA målt for å evaluere den terapeutiske responsen.

15 Hvis en tumorrespons (komplett remisjon [PSA-CR], delvis remisjon [PSA-PR], eller stabil klinisk kurs [ingen endring, PSA-NC]) ble detektert, fikk pasienten vaksinen en gang i måneden som vedlikeholdsbehandling ifølge den valgte administreringsformen. Pasientens respons på vaksinasjonsterapi ble vurdert i detalj som følger:

Komplett remisjon (PSA-CR): Normalisering av et opprinnelig forhøyet PSA-nivå, bekreftet ved måling etter et intervall på minst 4 uker. Normaliseringen defineres som et PSA-nadir på $<0,2$ ng/ml, noe som ville forventes etter radikal prostataektomi med fullstendig tumor- eller prostataekstirpasjon.

5

Partiell remisjon: a) $\text{PSA-PR} \leq 80\%$ (reduksjon i et innledningsvis forhøyet PSA-nivå med 80 %, bekreftet ved måling etter et intervall på minst 4 uker); og b) $\text{PSA-PR} \leq 50\%$ (reduksjon i et opprinnelig forhøyet PSA-nivå med 50 %, bekreftet ved måling etter et intervall på minst 4 uker)

10

Stabil sykdom (PSA-SD). Ingen vesentlig endring over en periode på minst fire uker. Dette inkluderer stabilisering og en reduksjon på mindre enn 50 %, og en økning på mindre enn 10 %, bekreftet ved måling etter et intervall på minst 4 uker.

15

Progresjon (PSA-PD): Økning i PSA-nivået på mer enn 10 %. I tilfellet av PSA-progresjon ble studien avsluttet.

20

Etter innmelding av pasientene i studien, ble den epitopspesifikke vaksinen anvendt (; proteinene som ble spesifikt uttrykt i prostatisk epitelceller (f.eks. PSMA / PSCA) ble tatt i betraktning. I tillegg til å undersøke den generelle effekten av den administrerte vaksinen med hensyn til å overvåke veksten av resterende tumorfraksjoner som vurderes ved PSA-overvåkning, undersøkte denne studien effektene av forskjellige vaksinasjonsfremgangsmåter med hensyn til effektiv modulering av immunsystemet. I tillegg til enkel subkutan administrering av peptidene alene, ble forskjellige kombinasjoner med adjuvanser også anvendt. Nærmere bestemt ble det anvendt depot- og adjuvansaktivitet for peptidvaksiner av Montanide (en formulering av den klassiske ufullstendige Freund's adjuvans egnet for anvendelse hos mennesker), som nylig er blitt beskrevet svært gunstig. For dette formålet ble 500 µl av peptidløsningen blandet med 500 µl av Montanide og administrert. Derved bygges en vann-i-olje-emulsjon som langsomt frigjør antigenet som inneholdes i den vandige fasen i løpet av uker. Den fysiske stabiliteten av emulsjonen er meget høy, og ved 4 °C kan den lagres i mer enn 3 måneder uten vesentlig faseseparasjon. Depotfunksjonen til Montanide har vært utnyttet i flere vaksinasjonsforsøk med gode resultater (Oka et al., 2004) undersøkt.

35

En grein av studie undersøkte effekten av vaksinasjon ved samtidig stimulering av immunsystemet ved vekstfaktorer, GM-CSF, Leukine®-løsning for injeksjon. GM-CSF er en svært vanlig anvendt adjuvans i peptidvaksineforsøk der flere av denne rapporterer forbedrede kliniske responser og T-celleresponser. I utgangspunktet er GM-CSF en dendrittcellerekrutterings- og differensieringsfaktor som antas å øke antallet dendrittceller ved vaksinenes injeksjonssete. Selv om GM-CSF ikke alene aktiverer antigenpresenterende celler som dendrittceller og makrofager har en indirekte aktivering in vivo blitt rapportert (Molenkamp et al., 2005)

En annen grein av studien undersøkte effekten av vaksinasjon ved samtidig aktivering av dendrittceller ved epikutan anvendelse av imiquimod. Imiquimod ble administrert som en 5 % salve (Aldara). Den har en sterk immunstimulerende effekt via sin effekt på TLR7-positive celler (f.eks. plasmacytoid-DC-er, Langerhans-celler, dermale DC-er) og aktiverer den MyD88-avhengige reaksjonsveien. De aktiverte APC-ene frigjør T-cellestimulerende og inflammatoriske cytokiner, oppregulerer kostimulering og migrerer til å drenere lymfeknuter. Imiquimods potensiale til å øke peptidindusert CTL-respons ved å blande antigenene i salven eller ved å påføre Aldara over s.c.- eller i.d.-injeksjonssetet for antigenene er blitt vist i dyremodeller.

En annen grein av studien undersøkte effekten av vaksinerings ved samtidig aktivering av dendrittceller ved å blande dem med protaminstabilisert mRNA som koder mucin-1 for å aktivere TLR 7/8. mRNA viser en bred aktivering av murine og humane immuncellepopulasjoner. Nærværet av det polybasiske proteinprotaminet i formuleringen øker halveringstiden til mRNA-et og induserer dannelsen av potensielt depotdannende partikler. Denne adjuvansen kan derfor kombinere depotdannelse og APC-aktiverende egenskaper.

Oppsummert inkluderte administreringsformene av vaksinen de følgende tilnærmingene:

- Subkutan administrering av peptidvaksinen emulgert i Montanide
- Subkutan administrering av peptidvaksinen emulgert i 500 µl Montanide i kombinasjon med topisk administrering av 225 µl av GM-CSF med målsettingen om å oppnå en sterkere immunrespons trigget ved samtidig administrering av vekstfaktorer.

- Subkutan administrering av peptidvaksinen emulgert i 500 µl Montanide i kombinasjon med lokal hypertermi, sistnevnte gitt med sikte på å oppnå en termisk induisert sterkere immunrespons
- 5 • Subkutan administrering av peptidvaksinen emulgert i 500 µl Montanide i kombinasjon med epikutant imiquimod for å aktivere dendrittceller via TLR 7
- Subkutan administrering av peptidvaksinen emulgert i 500 µl Montanide sammen med 55 µl mucin-1 mRNA/protami for å aktivere dendrittceller via TLR 7/8

10

Plan: Studievarigheten var 3 år.

15

De prostataspesifikke peptidvaksinene ble administrert til pasienter på dag 0, 7, 14, 28, 42 og 56. Hos pasienter med stabil sykdom eller en objektiv tumorrespons (PSA-CR eller PSA-PR), ble vaksinasjonene mottatt en gang i måneden i.d. inntil detekterbar progresjon oppstår. På grunnlag av erfaringen som er tilgjengelig så langt, tolereres peptidinjektionene uten vesentlige bivirkninger. Fordi responsen på vaksinasjonsterapien ble undersøkt serologisk utelukkende på grunnlag av PSA-målingen, ble det utført en test ved starten av studien for å bestemme

20 hvorvidt den administrerte vaksinen forstyrrer PSA-målingen in vitro, som kunne simulere en klinisk respons. På dag 0, 7, 14, 28, 42, 56 og 70 ble det tatt blodprøver for laboratorietester, PSA-nivåer, blodprosentforskjeller, FACS-analyse og cytokiner. Hvis behandlingen fortsetter etter dag 70, ble det utført 6-ukers PSA-overvåking for å detektere behandlingssvikt innen rimelig tid.

25

Behandlingen ble avsluttet hvis dokumentert progresjon av sykdommen forekom i form av en kontinuerlig PSA-økning.

30

Med start på dag 84 fortsatte immuniseringsterapien ved 4-ukers intervaller inntil dokumentert progresjon eller inntil dag 420 (15 måneder). Beslutninger om videre behandling (i vellykkede tilfeller) utenfor denne studien ble gjort på et sak-til-sak-grunnlag. Det forekom ingen uventede bivirkninger i denne studien.

35

Laboratorietestene inkluderte koagulering, elektrolytter, LDH, β 2-M, CK, leverenzymmer, bilirubin, kreatinin, urinsyre, totalprotein, koagulering, CRP, blodprosentforskjeller med utstrykning, PSA-nivå, cytokiner, FACS, Elispot. Analysen av den kutane reaksjonen på definerte bakterie- og soppantigener (48-72 timer

etter administrering, T-celleformidlet hypersensitivitet av forsinket type (DTH) vil tjene som en analyse av pasientens cellulære immunsystem før starten av studien).

Peptidene som kreves for studien (nona-peptider) ble fremstilt i laboratoriet til privatdosenten Dr. Stefan Stevanovic i avdelingen til Prof. H.-G. Rammensee. Disse peptidene ble rensset ved HPLC og analysert ved massespektrometri. Renheten av peptidene kan også kontrolleres ved hjelp av HPLC, massespektrometri og Edman-sekvensering. Ved hjelp av disse fremgangsmåtene kan renheten på opptil 98 % dokumenteres (som må betraktes som maksimum ifølge den nåværende tilstanden til fremgangsmåtene). De syntetiserte peptidene ble løst opp i DMSO (CryoSure, WAK Chemie Medical GmbH; 10 mg/ml), fortynnet til 1:10 i Ampuwa (Fresenius Kabi), og alikvotert under sterile forhold.

Klinisk respons

Hos to pasienter kunne PET-CT-skanningen avdekke lokalt tilbakefall etter lokal tumor ble oppdaget ved kontinuerlig digital rektal undersøkelse. Hos de resterende 17 pasientene kunne ikke plasseringen av sykdomsaktiviteten verifiseres ved studiestart.

Repetert laboratoriumevaluering av differensielle blodprosentforskjeller eller omfattende klinisk kjemi avdekket ingen abnormiteter eller endringer i løpet av studien.

Av de 19 pasientene reagerte 16 pasienter på Survivin-II-peptidet (IFN- γ ELISPOT, +/- ICS) ifølge SEQ ID NO: 12. Blant disse var 12 pasienter med induksjon av en anti-survivin-T-cellerespons ved vaksinerings, 2 med preeksisterende anti-Survivin-T-celler og 2 pasienter der det ikke ble bestemt om forhåndseksisterende anti-Survivin-T-celler var hyppige.

Biokjemisk respons

Komplett respons ble ansett som en ikke-detekterbar PSA-verdi ifølge den laveste verdien som kunne detekteres av laboratoriesamarbeidet etter innledningsvis forhøyet PSA. Målingen måtte bekreftes etter et intervall på minst fire uker. En PR > 80 % og > 50 % måtte revurderes etter fire uker tilsvarende. En PSA innen området på mindre enn 50 % reduksjon eller mindre enn 10 % økning reflekterte

stabil sykdom hvis den i det minste ble bekreftet etter fire uker. Progressiv sykdom ble vurdert som en økning på mer enn 10 % av PSA ved behandlingsstart. Biokjemisk respons hos pasienter som avsluttet studien ble fulgt inntil de mottok videre behandling med lokal stråling eller antihormonell behandling.

5

19 pasienter samtykket til å delta og dataene ble analysert med den lengste oppfølgingen som varte i ca. 3,75 år.

PSA-stabilitet og DT-økning

10

PSA-verdiene til to pasienter (10,2 %) viste stabilitet ifølge de ovennevnte kriteriene for biokjemisk reaksjon som sier at ingen økning av PSA-verdien som er større enn 10 % ved behandlingsstarten hadde skjedd ved studiestarten (fig. 6, tabellene 10, 11 og 12). Oppfølgingen i de to tilfellene ble gjennomført 14 og 16 måneder etter den siste vaksinepåføringen. Gjennomsnittlig varighet av stabiliteten var 24 måneder (28 og 31) ved dataterskelen der det ble anvendt gjennomsnittlig 18 vaksinasjoner (14 og 20).

15

Av disse to pasientene viste en pasient delvis respons > 50 % for en 9 måneders periode, etterfulgt av en periode med langsom PSA-økning med en doblingstid på 20,5 sammenlignet med 9,8 måneder før vaksinasjonen. Innledende PSA-tilbakefall startet 18 måneder etter kirurgi for en pT2pN0 Gleason 5-tumor.

20

I dataanalysen utviste pasient 8 stabil sykdom etter begynnelsen av vaksinasjonsprogrammet for 28 måneder siden. Han hadde stoppet behandlingen på grunn av en allergisk reaksjon etter 10 måneder og den 14. vaksinasjonen. Han hadde en ugunstig pT3b Gleason 3+4-situasjon med et PSA-nadir etter radikal prostataektomi ikke under 0,6 ng/ml og PSA-progresjon uten tidsforsinkelse etter innledende nedgang postoperativt. Doblingstiden avtok fra 6,6 måneder til 148 måneder.

25

30

Disse to pasientene mottok dermal Imiquimod på applikasjonssetet for hver peptidvaksinasjon.

PSA DT-økning uten PSA-stabilitet

5 PSA DT til pasient 11 ble økt fra 1,5 til 10,1 måneder i løpet av seks måneder av studien. Ettersom han startet med en PSA på 10,8 ng/ml og kom til 17,8 ng/ml avsluttet han studieprosedyrer for å motta antiandrogenmonoterapi uten maligne lesjoner visualisert i PET-CT. Han mottok Aldara som adjuvans.

10 Pasient 16 startet i vaksinebehandling pluss Mucin-1-mRNA/protamin med en doblingstid på 6,1 måneder. PSA-hastigheten sank med en halveringstid på 2,7 måneder i fem måneder, etterfulgt av en statistisk beregnet økning av PSA DT på 14,4 måneder som fortsetter 16 måneder etter behandlingsstarten. Med en innledende PSA på 0,29 ng/ml gikk han ned til 0,19 ng/ml i løpet av de første 5 månedene av studiebehandlingen, økte til 0,4 ng/ml de neste 8 månedene og avsluttet studien etter protokollen med 0,41 ng/ml 19 måneder etter

15 behandlingsstarten.

PSA-progresjon

20 Pasient 5 utviklet seg i løpet av studien ifølge den beregnede PSA-doblingstiden før vaksinasjon. Han opplevde imidlertid en PSA-nedgang med en halveringstid på 20,2 måneder etter behandlingsslutten for en vedvarende periode på 10 måneder ved dataterskelen. Han mottok fortsatt ingen sekundær behandling etter vaksineringslutten. Han ble vaksinert med Montanide som eneste adjuvans.

25 **Tabell 10: PSA-doblingstid i måneder**

	Totalt	%	Geometrisk gjennomsnitt	DT- område
PSA DT før vaksinasjon i måneder	19		8,3	1,5 - 44,8
PSA DT ved studieslutt eller slutten av oppfølgingen	18*		11,2	2,2 - 148
Ingen endring av PSA DT under vaksinasjonen	11	58		2,2 - 44,8
Økt PSA DT fortsetter ved studieslutt	4	21		

	Totalt	%	Geometrisk gjennomsnitt	DT- område
Ingen endring av PSA DT under vaksinasjonen, men den falt etterpå	1	5		
Foreløpig PSA-nedgang eller DT- økning etterfulgt av DT-nedgang	3	16		
* PSA DT ved studieslutt eller slutten av oppfølgingen ble ikke inkludert for pat. 5 på grunn av PSA-nedgang				

7. Binding av begrensede peptider ifølge oppfinnelsen av HLA-klasse I til HLA-A*0201

5 Formål og oppsummering

Formålet med denne analysen var å evaluere affiniteten til peptider av HLA-klasse I med MHC-molekylet kodet av HLA-A*0201-allelet ettersom dette er en viktig parameter for virkemåten til IMA950. Affinitetene til HLA-A*0201 var middels til høye for alle de 10 HLA-klasse I-begrensede peptidene i IMA950 og MET-001, dissosiasjonskonstantene (KD) er i området fra 0,14 (MET-001) til 2,05 nM (CSP-001). Alle verdiene er i området mellom 0,1 for det sterke bindemidlet HBV-001 og 4.4 for det mellomliggende bindemidlet MUC-001. Disse resultatene bekreftet den sterke bindingsaffiniteten til alle peptidene av HLA-klasse I av IMA950-vaksine kandidat og den MET-005-avledede MET-001 til HLA-A*02.

Testprinsipp

Stabile HLA/peptidkomplekser består av tre molekyler: HLA-tungkjede, beta-2-mikroglobulin (b2m) og peptidliganden. Aktiviteten til denaturerte rekombinante HLA-A*-0201-tungkjedemolekyler alene kan bevares og gjør dem til funksjonelle ekvivalenter av «tomme HLA-A *0201-molekyler». Når fortynnet i vandig buffer som inneholder b2 m og et passende peptid, bretter disse molekyler seg raskt og effektivt på en helt peptidavhengig måte. Tilgjengeligheten av disse molekylerne anvendes i en ELISA-basert analyse for å måle affiniteten av interaksjon mellom peptid og molekylet av HLA-klasse I (Sylvester-Hvid et al., 2002).

Rensede rekombinante HLA-A*0201-molekyler inkuberes sammen med b2 m og graderte doser av peptidet av interesse. I stedet for full-lengde MET-005 som ikke er i besittelse av bindingskapasiteter av HLA-klasse I, ble det detekterte A*0- bindingsproduktet MET-001 inkludert i analysen som genereres in vivo fra MET-005 ved naturlig forekommende antigenbehandling. Mengden av de novo-brettede HLA/peptidkompleksene ble bestemt ved en kvantitativ ELISA. Dissosiasjonskonstantene (KD-verdiene) ble beregnet ved hjelp av en standard kurve registrert fra fortynninger av et kalibrert HLA/peptidkompleks.

Resultater

Resultatene er vist i figur 2. En lavere KD-verdi reflekterer høyere affinitet til HLA-A*0201. Flesteparten av IMA950-peptidene hadde lignende og sterk affinitet til HLA-A*0201 innen området fra 0,1 (HBV-001, sterkt bindemiddel) til 44,4 nM (MUC-001, mellomliggende bindemiddel). Dermed har alle TUMAP-ene av IMA950-klasse I en middels til sterk bindingsaffinitet til MHC-molekylet A*02.

8. Binding av begrensede peptider av HLA-klasse II ifølge oppfinnelsen til HLA-DR

Formål og oppsummering

TUMAP-er av klasse II aktiverer T-hjelperceller som spiller en avgjørende rolle i å bistå funksjonen av CTL-er trigget av begrensede TUMAP-er av klasse I. Binding av peptidene av IMA950-klasse til flere forskjellige molekyler av HLA-klasse II (promiskuøs binding) er viktig for å sikre at flertallet av pasientene behandlet med vaksine kandidaten IMA950 er i stand til å dra nytte av en støttende T-hjelpercellerespons. HLA-DR for eksempel, det mest overveiende uttrykte molekylet av human HLA-klasse II, er sterkt polymorf med flere hundre kjente alleler. Basert på kjente allelfrekvenser for HLA-DRB1-haplotyper og veletablerte bindingsalgoritmer, kan det forutsies at begge ligandene av HLA-klasse II i IMA950 - IMA-BIR-002 og IMA-MET-005 - er promiskuøse HLA-DR-bindingspeptider. Mer detaljert er sannsynligheten for at en HLA-A*02-positiv kaukasier uttrykker minst ett egnet HLA-DR-allel >90 % for begge TUMAP-ene av IMA950-klasse II. Ettersom de resterende humane allelene HLA-DQ og -DP av klasse-II ble utelatt fra denne beregningen på grunn av manglende frekvensdata eller bindingsforutsigelsesalgoritmer, er den virkelige promiskuiteten

sannsynligvis enda høyere. Den beregnede promiskuiteten av de to TUMAP-ene av IMA950-klasse II er i samme størrelsesorden som for den kjente pan-DR-epitopen (PADRE, genotypisk frekvens $F_{projisert} = 93,1 \%$). I tillegg ble den promiskuøse bindingen av disse peptidene bekreftet eksperimentelt av bindingsanalyser in vitro. Videre, for IMA-BIR-002, kunne det detekteres en høy in vivo-immunogenisitet (se ovenfor). Oppsummert bekrefter disse resultatene at MET-005 og BIR-002 er promiskuøse HLA-DR-bindingspeptider.

Bindingsforutsigelsesprinsippet

Ved hjelp av SYFPEITHI-algoritmen utviklet ved Universitetet i Tübingen (Rammensee et al., 1997; Rammensee et al., 1999) ble binding av TUMAP-er av IMA950-klasse II til flere vanlige HLA-DR-alleler rangert. Algoritmen har allerede blitt anvendt med hell for å identifisere epitoper av klasse I og klasse II fra et bredt spekter av antigener, f.eks. fra de humane tumorassosierte antigenene TRP2 (klasse I) (Sun et al., 2000) og SSX2 (klasse II) (Neumann et al., 2004). Bindingsterskelen ble definert ved en poengsum på 18 basert på analysen av bindingsresultater til kjente publiserte promiskuøse HLA-DR-ligander.

Publiserte HLA-DR-haplotypefrekvenser mellom den HLA-A*02-positive kaukasiske populasjonen (Mori et al., 1997) og frekvenser av høyoppløselige haplotyper (Chanock et al., 2004) ble anvendt (se tabell 2). Haplotypefrekvensen er frekvensen av en distinkt allel på et individuelt kromosom. På grunn av det diploide kromosomsettet i pattedyrceller er hyppigheten av genotypisk forekomst av dette allelet høyere, og kan beregnes ved å benytte Hardy-Weinberg-prinsippet (haplotypefrekvens G_f resulterer i en genotypisk forekomst F ($F = 2G_f - G_f^2$)).

Summen av frekvensen av DRBI-haplotyper med kjent SYFPEITHI-matriks og kjent individuell frekvens blant den A*02-positive kaukasiske populasjonen er 47,8 %. Derfor ble den forutsagte bindingsfordelingen av TUMAP-er av klasse II til disse allelene projisert til de resterende 52,2 % av DRB1-allelene som disse dataene ikke er tilgjengelige for.

Til slutt defineres promiskuøs binding som binding av et peptid til flere HLA-DR-alleler der sannsynligheten for at en av disse uttrykkes i den kaukasiske populasjonen er minst 50 %.

Prinsippet med bindingsanalyse in vitro (ProImmune REVEAL™)

IMA-BIR-002 og IMA-MET-005 ble satt sammen med HLA-DR-brede antigener (HLA-DR1 til DR7, som også omfatter splittantigenene HLA-DR11 til -DR15 (Mori et al., 1997)), og analysert ved hjelp av REVEAL™ MHC:peptidbindingsanalyse (ProImmune, Oxford, UK) for å bestemme deres grad av innføring i MHC-molekyler. I denne analysen ble bindingen sammenlignet med det beståtte/ikke beståtte kontrollbindemidlet, og et positivt kontrollpeptid for hvert HLA-DR-antigen.

Resultater

Basert på forutsigelsen fra SYFPEITHI-algoritmen er IMA-BIR-002 og IMA-MET-005 sannsynlig å binde til henholdsvis 7/8 og 8/8 av HLA-DR-allelene med kjent bindingsmotiv (tabell 11). Sannsynligheten for at en HLA-A*02-positiv kaukasier uttrykker minst ett egnet HLA-DRB1-allel for IMA-BIR-002 eller IMA-MET-005 er henholdsvis 92,6 % og nær 100 %. Derfor forutsies begge peptidene av IMA950-klasse II å være promiskuøse HLA-DR-bindemidler.

Hvis haplotypehyppigheten for binding av HLA-DRB1-alleler ble overvurdert gjennom denne tilnærmingen ved faktor to, ville deres genotypiske forekomst fortsatt være > 50 % for alle TUMAP-er av klasse II i IMA950. I tillegg ble forsøksbekreftelsen for promiskuøs binding av IMA-BIR-002 til HLA-DR1, 3, 4 og 11 oppnådd fra bindingsdata in vitro (figur 3). For IMA-MET-005 tyder bindingsdata in vitro av to overlappende 15-merer som dekker hele sekvensen på en binding til HLA-DR11; ProImmune REVEAL™ er imidlertid ment som et grovt screeningverktøy for identifiseringen av potensielle epitoper av HLA-klasse II. Gode HLA-DR-bindemidler med langsomme assosiasjonshastigheter kan ha blitt rapportert falskt eller negativt som ikke-bindemidler i denne analysen. Dermed kan ikke ikke-promiskuiteten til HLA-DR-bindingen av IMA-MET-005 in vivo utledes fra negative in vitro-ProImmune REVEAL™-data. Dermed er en promiskuøs HLA-DR-binding av IMA-MET-005 i en IMA950-basert vaksinerings god mulighet. Ettersom det ikke finnes tilstrekkelige data om bindingsegenskaper og frekvens for de øvrige klasse II-lokusene HLA-DQ og -DP, er disse molekylerne utelatt fra beregningen. Likevel er disse molekylerne ytterligere bindingsmuligheter for TUMAP-ene av IMA950-klasse II.

Ettersom IMA-BIR-002 har bevist bred immunogenisitet i en klinisk studie hos pasienter med prostatakraft med forskjellige HLA-DR-alleler, har promiskuiteten i dette peptidet av klasse II blitt bevist in vivo.

5 Som konklusjon tyder *in silico*-analyse av HLA-DR-bindingsegenskapene til de to peptidene av klasse II inneholdt i IMA950 og ekstra eksperimentelle bevis fra *in vitro*-analyser og fra en klinisk studie med BIR-002 sterkt på at disse TUMAP-ene er promiskuøse bindemidler av molekyler av human klasse II HLA

10 Tabell 11: Bindingsresultatene til TUMAP-ene av IMA950-klasse II til HLA-DR-allelene med kjente bindingsmotiv. SYFPEITHI-bindingsresultatene til de vanligste HLA-DRB1-allelene i den kaukasiske populasjonen er vist. p gir haplotypfrekvenser blant HLA-A*02-positive kaukasiere. Peptidet ble ansett som å binde til et HLA-molekyl hvis resultatet var likt eller høyere enn 18.

15 Akkumulering av p-verdiene for binding av DRB1-alleler resulterer i den minimale haplotypfrekvensen $p_{\min}$. Ekstrapolering av disse frekvensene til alle DRB1-allelene inkludert de med ufullstendig bindingsforutsigelsesmatriks eller frekvensdata gir den projiserte haplotypfrekvensen $p_{\text{projisert}}$ som tilsvarer frekvensen for genotypisk forekomst $F_{\text{projisert}}$. n.d. = ingen data

IMA-BIR-002								
DRB1* allel	0101	0301	0401	0404	0701	1101	1104	1501
SYFPEITHI-poengsum	28	29	28	24	14	32	24	30
p	6,6 %	5,9 %	9,6 %	6,0 %	13,0 %	4,4 %	2,3 %	n.d.
forutsagt binding	ja	ja	ja	ja	nei	ja	ja	ja
				P_{min}				34,8 %
				Haplotypisk frekvens p_{projisert}				72,8 %
				Genotypisk frekvens F_{projisert}				92,6 %
IMA-MET-005								
DRB1* allel	0101	0301	0401	0404	0701	1101	1104	1501
SYFPEITHI-poengsum	28	20	26	26	28	20	22	22

IMA-BIR-002								
DRB1* allele	0101	0301	0401	0404	0701	1101	1104	1501
p	6,6 %	5,9 %	9,6 %	6,0 %	13,0 %	4,4 %	2,3 %	n.d.
forutsagt binding	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
				p_{min}				47,8 %
				Haplotypisk frekvens p_{projisert}				100,0 %
				Genotypisk frekvens F_{projisert}				100,0 %

Referanseliste

- 5 Aitkenhead M, Wang SJ, Nakatsu MN, Mestas J, Heard C, Hughes CC (2002). Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. Microvasc. Res. 63, 159-171.
- 10 Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Imran AK (2007). Survivin expression correlates with unfavourable prognoses in invasive ductal carcinoma of the breast. Med J Malaysia 62, 6-8.
- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, Heyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science 274, 94-96.
- 15 Angileri FF, Aguenouz M, Conti A, La TD, Cardali S, Crupi R, Tomasello C, Germano A, Vita G, Tomasello F (2008). Nuclear factor-kappaB activation and differential expression of survivin and Bcl-2 in human grade 2-4 astrocytomas. Cancer.
- Ariyama T, Hasegawa K, Inazawa J, Mizuno K, Ogimoto M, Katagiri T, Yakura H (1995). Assignment of the human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band 7q31.3. Cytogenet. Cell Genet. 70, 52-54.
- 20 Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. Cancer Res. 61, 6451-6458.
- 25 Bamea G, Silvennoinen O, Shaanan B, Honegger AM, Canoll PD, D'Eustachio P, Morse B, Levy JB, Laforgia S, Huebner K,. (1993). Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. Mol. Cell Biol. 13, 1497-1506.

- Bartsch S, Bartsch U, Dorries U, Faissner A, Weller A, Ekblom P, Schachner M (1992). Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J Neurosci.* 12, 736-749.
- Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P (2000). Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes. *Blood* 95, 3964-3969.
- Bertoletti A, Chisari FV, Penna A, Guilhot S, Galati L, Missale G, Fowler P, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut RC,. (1993). Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67, 2376-2380.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.
- Blum R, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, Kloog Y (2006). Suppression of survivin expression in glioblastoma cells by the Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid promotes caspase-dependent apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2337-2347.
- Bolliger MF, Frei K, Winterhalter KH, Gloor SM (2001). Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *Biochem. J* 356, 581-588.
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.
- Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD (1983). Human gliomamesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.* 43, 2796-2805.
- Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D (2004). Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol.* 26, 177-181.
- Brekke C, Lundervold A, Enger PO, Brekken C, Stalsett E, Pedersen TB, Haraldseth O, Kruger PG, Bjerkvig R, Chakenya M (2006). NG2 expression regulates vascular morphology and function in human brain tumours. *Neuroimage.* 29, 965-976.
- Burton EC, Prados MD (2000). Malignant gliomas. *Curr. Treat. Options. Oncol* 1, 459-468.
- Campoli MR, Chang CC, Kageshita T, Wang X, McCarthy JB, Ferrone S (2004). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance. *Crit Rev. Immunol.* 24, 267-296.
- Casati C, Dalerba P, Rivoltini L, Gallino G, Deho P, Rini F, Belli F, Mezzanzanica D, Costa A, Andreola S, Leo E, Parmiani G, Castelli C (2003). The apoptosis

inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 63, 4507-4515.

CBTRUS. Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report. 2006. Ref Type: Internet Communication

5 Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS (2002). Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 20, 1063-1068.

10 Chanock SJ, Foster CB, Miller FW, O'Hanlon TP (2004). HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA. *Hum. Immunol.* 65, 1211-1223.

15 Chekenya M, Enger PO, Thorsen F, Tysnes BB, Al-Sarraj S, Read TA, Furmanek T, Mahesparan R, Levine JM, Butt AM, Pilkington GJ, Bjerkvig R (2002a). The glial precursor proteoglycan, NG2, is expressed on tumour neovasculature by vascular pericytes in human malignant brain tumours. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 28, 367-380.

Chekenya M, Hjelstuen M, Enger PO, Thorsen F, Jacob AL, Probst B, Haraldseth O, Pilkington G, Butt A, Levine JM, Bjerkvig R (2002b). NG2 proteoglycan promotes angiogenesis-dependent tumor growth in CNS by sequestering angiostatin. *FASEB J* 16, 586-588.

20 Chekenya M, Immervoll H (2007). NG2/HMP proteoglycan as a cancer therapeutic target. *Methods Mol. Biol.* 361, 93-117.

25 Chekenya M, Krakstad C, Svendsen A, Netland IA, Staalesen V, Tysnes BB, Selheim F, Wang J, Sakariassen PO, Sandal T, Lonning PE, Flatmark T, Enger PO, Bjerkvig R, Sioud M, Stallcup WB (2008). The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. *Oncogene.* Chekenya M, Pilkington GJ (2002). NG2 precursor cells in neoplasia: functional, histogenesis and therapeutic implications for malignant brain tumours. *J Neurocytol.* 31, 507-521.

30 Chekenya M, Rooprai HK, Davies D, Levine JM, Butt AM, Pilkington GJ (1999). The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: role in malignant progression of human brain tumours. *Int J Dev. Neurosci.* 17, 421-435.

Chiquet-Ehrismann R (1993). Tenascin and other adhesion-modulating proteins in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 4, 301-310.

35 Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 200, 488-499.

Conacci-Sorrell M, Kaplan A, Raveh S, Gavert N, Sakurai T, Ben-Ze'ev A (2005). The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer Res.* 65, 11605-11612.

5 Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A (2002). Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2058-2072

Corso S, Migliore C, Ghiso E, De RG, Comoglio PM, Giordano S (2008). Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. *Oncogene* 27, 684-693.

10 Davis JQ, Bennett V (1994). Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol. Chem.* 269, 27163-27166.

Dazzi C, Cariello A, Giannini M, Del DM, Giovanis P, Fiorentini G, Leoni M, Rosti G, Turci D, Tienghi A, Vertogen B, Zumaglini F, De GU, Marangolo M (2000). A sequential chemoradiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. *Anticancer Res.* 20, 515-518.

20 Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S,. (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 147-154.

Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, Valente G, Giordano S, Cortesina G, Comoglio PM (2000). Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* 19, 1547-1555.

Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol.* 100, 216-232.

30 Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van WC (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 61, 5911-5918.

Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Buchler MW, Korc M (1994). Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 54, 5775-5778.

- Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K (2007). Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer* 121, 276-283.
- 5 Erfurt C, Sun Z, Haendle I, Schuler-Thurner B, Heirman C, Thielemans K, van der BP, Schuler G, Schultz ES (2007). Tumor-reactive CD4+ T cell responses to the melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan in melanoma patients and healthy individuals in the absence of autoimmunity. *J Immunol.* 178, 7703-7709.
- Feng L, Hatten ME, Heintz N (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12, 895-908.
- 10 Feng L, Heintz N (1995). Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development* 121, 1719-1730.
- Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, Comoglio PM (1995). The Met/HGF receptor is over-
15 expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10, 739-749.
- Fischer J, Palmedo G, von KR, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G (1998). Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17, 733-739.
- 20 Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN, Faure M, Howlett AR, Lipson KE, Woude GF, Webb CP (2001). Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10722-10727.
- Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF (2000). Met receptor tyrosine kinase:
25 enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19, 5582-5589.
- Garcion E, Halilagic A, Faissner A, ffrench-Constant C (2004). Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131, 3423-3432.
- Gary SC, Kelly GM, Hockfield S (1998). BEHAB/brevican: a brain-specific lectican
30 implicated in gliomas and glial cell motility. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 576-581.
- Gary SC, Zerillo CA, Chiang VL, Gaw JU, Gray G, Hockfield S (2000). cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma. *Gene* 256, 139-147.
- 35 Gebbink MF, van E, I, Hateboer G, Suijkerbuijk R, Beijersbergen RL, Geurts van KA, Moolenaar WH (1991). Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.* 290, 123-130.

Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC (2008). Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol. Chem.* 283, 5188-5194.

Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, Comoglio PM (1989). Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature* 339, 155-156.

5 Glass R, Synowitz M, Kronenberg G, Walzlein JH, Markovic DS, Wang LP, Gast D, Kiwit J, Kempermann G, Kettenmann H (2005). Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *J Neurosci.* 25, 2637-2646.

10 Glatz JF, Luiken JJ, van BM, van d, V (2002). Cellular lipid binding proteins as facilitators and regulators of lipid metabolism. *Mol. Cell Biochem.* 239, 3-7.

Glatz JF, Storch J (2001). Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 267-274.

Godbout R, Bisgrove DA, Shkolny D, Day RS, III (1998). Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. *Oncogene* 16, 1955-1962.

15 Grumet M, Mauro V, Burgoon MP, Edelman GM, Cunningham BA (1991). Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol.* 113, 1399-1412.

Grunda JM, Nabors LB, Palmer CA, Chhieng DC, Steg A, Mikkelsen T, Diasio RB, Zhang K, Allison D, Grizzle WE, Wang W, Gillespie GY, Johnson MR (2006). Increased expression of thymidylate synthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USP10) and survivin is associated with poor survival in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol.* 80, 261-274.

25 Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 27, 2897-2909.

Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2002). A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat. Genet.* 32, 411-414.

30 Hau P, Kunz-Schughart LA, Rummele P, Arslan F, Dorfelt A, Koch H, Lohmeier A, Hirschmann B, Muller A, Bogdahn U, Bosserhoff AK (2006). Tenascin-C protein is induced by transforming growth factor-beta1 but does not correlate with time to tumor progression in high-grade gliomas. *J Neurooncol.* 77, 1-7.

35 Heimberger AB, Hussain SF, Aldape K, Sawaya R, Archer GA, Friedman H, Reardon D, Friedman A, Bigner DD, Sampson JH. Tumor-specific peptide vaccination in newly-diagnosed patients with GBM. *Journal of Clinical Oncology,*

2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 2529. 20-6-2006.

Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002). Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int. J Cancer* 98, 362-369.

Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, Parker AS, Leibovich BC, Jiang Z, Kwon ED (2008). External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 112, 1471-1479.

Hu B, Kong LL, Matthews RT, Viapiano MS (2008). The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promotes glioma cell motility. *J Biol. Chem.*

Huang PH, Cavenee WK, Furnari FB, White FM (2007a). Uncovering therapeutic targets for glioblastoma: a systems biology approach. *Cell Cycle* 6, 2750-2754.

Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK, Furnari FB, White FM (2007b). Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 12867-12872.

Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27-29.

Jaworski DM, Fager N (2000). Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp-3) mRNA expression during rat CNS development. *J Neurosci. Res.* 61, 396-408.

Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S (1999). Intracranial injury acutely induces the expression of the secreted isoform of the CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican. *Exp. Neurol.* 157, 327-337.

Jaworski DM, Kelly GM, Piepmeier JM, Hockfield S (1996). BEHAB (brain enriched hyaluronan binding) is expressed in surgical samples of glioma and in intracranial grafts of invasive glioma cell lines. *Cancer Res.* 56, 2293-2298.

Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Rock KL, Liu Q, Hsieh CC, Li C, Chen W, Duan HO, McDougal S, Wu CL (2006). Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol* 7, 556-564

- Jiang Z, Lohse CM, Chu PG, Wu CL, Woda BA, Rock KL, Kwon ED (2008). Oncofetal protein IMP3: a novel molecular marker that predicts metastasis of papillary and chromophobe renal cell carcinomas. *Cancer* 112, 2676-2682.
- 5 Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4611-4615.
- Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (2003). Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer* 97, 1077-1083.
- 10 Kaloshi G, Mokhtari K, Carpentier C, Taillibert S, Lejeune J, Marie Y, Delattre JY, Godbout R, Sanson M (2007). FABP7 expression in glioblastomas: relation to prognosis, invasion and EGFR status. *J Neurooncol.* 84, 245-248.
- Kammula US, Kuntz EJ, Francone TD, Zeng Z, Shia J, Landmann RG, Paty PB, Weiser MR (2007). Molecular co-expression of the c-Met oncogene and hepatocyte growth factor in primary colon cancer predicts tumor stage and clinical outcome. *Cancer Lett.* 248, 219-228.
- 15 Kaplan R, Morse B, Huebner K, Croce C, Howk R, Ravera M, Ricca G, Jaye M, Schlessinger J (1990). Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 7000-7004.
- 20 Kendall SE, Najbauer J, Johnston HF, Metz MZ, Li S, Bowers M, Garcia E, Kim SU, Barish ME, Aboody KS, Glackin CA (2008). Neural Stem Cell Targeting of Glioma is Dependent on PI3K Signaling. *Stem Cells.*
- Kim CH, Bak KH, Kim YS, Kim JM, Ko Y, Oh SJ, Kim KM, Hong EK (2000). Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg Neurol.* 54, 235-240.
- 25 Knutson KL, Disis ML (2005). Augmenting T helper cell immunity in cancer. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 5, 365-371.
- Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res.* 57, 5391-5398.
- 30 Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Vasmataz G (2005). Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res.* 11, 5128-5139.
- 35 Krueger NX, Streuli M, Saito H (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J* 9, 3241-3252.

- Kucharczak J, Pannequin J, Camby I, Decaestecker C, Kiss R, Martinez J (2001). Gastrin induces over-expression of genes involved in human U373 glioblastoma cell migration. *Oncogene* 20, 7021-7028.
- 5 Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F, Bruning G, Spener F, Muller T (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 120, 2637-2649.
- Lal A, Peters H, St CB, Haroon ZA, Dewhirst MW, Strausberg RL, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Riggins GJ (2001). Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl. Cancer Inst.* 93, 1337-1343.
- 10 Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C, Briault S (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum. Genet.* 74, 552-557.
- 15 Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, Picker J (2008). Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur. J Hum. Genet.* 16, 614-618.
- Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Bamea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T,. (1993). The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol. Chem.* 268, 10573-10581.
- 20 Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20, 8125-8135.
- 25 Li L, Xu H, Spaulding BO, Cheng L, Simon R, Yao JL, di Sant'agnese PA, Bourne PA, Huang J (2008). Expression of RNA-binding protein IMP3 (KOC) in benign urothelium and urothelial tumors. *Hum. Pathol.*
- Liang Y, Bollen AW, Aldape KD, Gupta N (2006). Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed in infiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. *BMC. Cancer* 6, 97.
- 30 Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK, Lamborn KR, Berger MS, Botstein D, Brown PO, Israel MA (2005). Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 5814-5819.
- 35 Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G (2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J Biol. Chem.* 280, 18517-18524.

- Liu X, Chen N, Wang X, He Y, Chen X, Huang Y, Yin W, Zhou Q (2006). Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 905-913.
- Livingston BD, Crimi C, Grey H, Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, Grey H, Chesnut RW, Sette A (1997). The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* 159, 1383-1392.
- Lo ML, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, Chieffi P, Tramontano D, De RG, Altieri DC (2001): Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 70, 249-254.
- Long IS, Han K, Li M, Shirasawa S, Sasazuki T, Johnston M, Tsao MS (2003). Met receptor overexpression and oncogenic Ki-ras mutation cooperate to enhance tumorigenicity of colon cancer cells in vivo. *Mol. Cancer Res.* 1, 393-401.
- Lu KV, Jong KA, Kim GY, Singh J, Dia EQ, Yoshimoto K, Wang MY, Cloughesy TF, Nelson SF, Mischel PS (2005). Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin. *J Biol Chem.* 280, 26953-26964.
- Macdonald DR (2001). Temozolomide for recurrent high-grade glioma. *Semin. Oncol* 28, 3-12.
- Mackie EJ, Halfter W, Liverani D (1988). Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol.* 107, 2757-2767.
- Mahlamaki EH, Barlund M, Tanner M, Gorunova L, Hoglund M, Karhu R, Kallioniemi A (2002). Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* 35, 353-358.
- Maulik G, Kijima T, Ma PC, Ghosh SK, Lin J, Shapiro GI, Schaefer E, Tibaldi E, Johnson BE, Salgia R (2002). Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 620-627.
- Mellai M, Caldera V, Patrucco A, Annovazzi L, Schiffer D (2008). Survivin expression in glioblastomas correlates with proliferation, but not with apoptosis. *Anticancer Res.* 28, 109-118.
- Miller SJ, Li H, Rizvi TA, Huang Y, Johansson G, Bowersock J, Sidani A, Vitullo J, Vogel K, Parysek LM, DeClue JE, Ratner N (2003). Brain lipid binding protein in axon-Schwann cell interactions and peripheral nerve tumorigenesis. *Mol. Cell Biol.* 23, 2213-2224.
- Mita R, Coles JE, Glubrecht DD, Sung R, Sun X, Godbout R (2007). B-FABP-expressing radial glial cells: the malignant glioma cell of origin? *Neoplasia.* 9, 734-744.

- Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H (2008). Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*
- 5 Mizuno K, Higuchi O, Ihle JN, Nakamura T (1993). Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 178-186.
- Molenkamp BG, Vuylsteke RJ, van Leeuwen PA, Meijer S, Vos W, Wijnands PG, Scheper RJ, de Gruijl TD (2005). Matched skin and sentinel lymph node
- 10 samples of melanoma patients reveal exclusive migration of mature dendritic cells. *Am. J Pathol.* 167, 1301-1307.
- Mondino A, Giordano S, Comoglio PM (1991). Defective posttranslational processing activates the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor). *Mol. Cell Biol.* 11, 6084-6092.
- 15 Montesano R, Soriano JV, Malinda KM, Ponce ML, Bafico A, Kleinman HK, Bottaro DP, Aaronson SA (1998). Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell Growth Differ.* 9, 355-365.
- Morales G, Hubert M, Brummendorf T, Treubert U, Tamok A, Schwarz U, Rathjen FG (1993). Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the
- 20 cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* 11, 1113-1122.
- Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL (1997). HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. *Transplantation* 64, 1017-1027.
- Moriyama T, Kataoka H, Kono M, Wakisaka S (1999). Expression of hepatocyte
- 25 growth factor/scatter factor and its receptor c-Met in brain tumors: evidence for a role in progression of astrocytic tumors (Review). *Int J Mol. Med* 3, 531-536.
- Mueller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, Micha A, Zimmerhackl F, Hameister H, Varga G, Friess H, Buchler M, Beger HG, Vila MR, Adler G, Gress TM (1997). Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain
- 30 containing protein. *Oncogene* 14, 2729-2733.
- Mulholland PJ, Fiegler H, Mazzanti C, Gorman P, Sasieni P, Adams J, Jones TA, Babbage JW, Vatcheva R, Ichimura K, East P, Poullikas C, Collins VP, Carter NP, Tomlinson IP, Sheer D (2006). Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme. *Cell Cycle* 5, 783-791.
- 35 Nakaigawa N, Yao M, Baba M, Kato S, Kishida T, Hattori K, Nagashima Y, Kubota Y (2006). Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma. *Cancer Res.* 66, 3699-3705.

- Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zamegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6, 501-504.
- 5 Nam DH, Kong DS, Kyeung MJ, Kim S. c-MET: A Potential Candidate of Glioblastoma Cancer Stem Cell Targeted Marker. The Role of Cancer Stem Cells in the Initiation and Propagation of Tumorigenesis - An AACR Special Conference in Cancer Research, Los Angeles. Conference Proceedings, A45. 12-2-2008. 12-2-0080. Ref Type: Conference Proceeding
- 10 Napolitano M, Keime-Guibert F, Monjour A, Lafitte C, Ameri A, Cornu P, Broet P, Delattre JY (1999). Treatment of supratentorial glioblastoma multiforme with radiotherapy and a combination of BCNU and tamoxifen: a phase II study. *J Neurooncol.* 45, 229-235.
- 15 Neumann F, Wagner C, Kubuschok B, Stevanovic S, Rammensee HG, Pfreundschuh M (2004). Identification of an antigenic peptide derived from the cancer-testis antigen NY-ESO-1 binding to a broad range of HLA-DR subtypes. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 589-599.
- Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000). A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat. Rev.* 26, 397-409.
- 20 Nutt CL, Matthews RT, Hockfield S (2001). Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage of BEHAB/brevican. *Neuroscientist.* 7, 113-122.
- O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M (2003). Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr. Cancer Drug Targets.* 3, 131-152.
- 25 Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Ikegame K, Hosen N, Yoshihara S, Wu F, Fujiki F, Murakami M, Masuda T, Nishida S, Shirakata T, Nakatsuka S, Sasaki A, Udaka K, Dohy H, Aozasa K, Noguchi S, Kawase I, Sugiyama H (2004). Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13885-13890.
- 30 Olivero M, Valente G, Bardelli A, Longati P, Ferrero N, Cracco C, Terrone C, Rocca-Rossetti S, Comoglio PM, Di Renzo MF (1999). Novel mutation in the ATP-binding site of the MET oncogene tyrosine kinase in a HPRCC family. *Int. J Cancer* 82, 640-643.
- 35 Pai R, Nakamura T, Moon WS, Tamawski AS (2003). Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling by cross-talk between two distinct growth factor receptors. *FASEB J* 17, 1640-1647.

- Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45; 895-904.
- Park WS, Dong SM, Kim SY, Na EY, Shin MS, Pi JH, Kim BJ, Bae JH, Hong YK, Lee KS, Lee SH, Yoo NJ, Jang JJ, Pack S, Zhuang Z, Schmidt L, Zbar B, Lee JY (1999). Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 59, 307-310.
- Perez-Pinera P, Garcia-Suarez O, Menendez-Rodriguez P, Mortimer J, Chang Y, Astudillo A, Deuel TF (2007). The receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP)beta/zeta is expressed in different subtypes of human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 5-10.
- Perrin FE, Rathjen FG, Stoeckli ET (2001). Distinct subpopulations of sensory afferents require F11 or axonin-1 for growth to their target layers within the spinal cord of the chick. *Neuron* 30, 707-723.
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157-173.
- Piesche M, Hildebrandt Y, Zettl F, Chapuy B, Schmitz M, Wulf G, Trumper L, Schroers R (2007). Identification of a promiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Hum. Immunol.* 68, 572-576.
- Ponzetto C, Bardelli A, Maina F, Longati P, Panayotou G, Dhand R, Waterfield MD, Comoglio PM (1993). A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol. Cell Biol.* 13, 4600-4608.
- Prados MD, Levin V (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin. Oncol* 27, 1-10.
- Prakash S, Sarran L, Socci N, DeMatteo RP, Eisenstat J, Greco AM, Maki RG, Wexler LH, LaQuaglia MP, Besmer P, Antonescu CR (2005). Gastrointestinal stromal tumors in children and young adults: a clinicopathologic, molecular, and genomic study of 15 cases and review of the literature. *J Pediatr. Hematol. Oncol* 27, 179-187.
- Previsani, N. and Lavanchy, D.: Hepatitis B (internal immatics research report)
- Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H (2008). IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 21, 431-437.
- Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC, Chen J, Wang LM, Mai WY, Min HQ, Hong MH, Vande Woude GF, Resau JH, Teh BT (2002). Met protein expression

level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 62, 589-596.

Rahimi N, Tremblay E, McAdam L, Park M, Schwall R, Elliott B (1996). Identification of a hepatocyte growth factor autocrine loop in a murine mammary carcinoma. *Cell Growth Differ.* 7, 263-270.

Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C, Dinauer C, Tuttle RM, Francis GL (2000). Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 53, 635-644.

Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

Rammensee, H.G., Bachmann, J., and Stevanovic, S. (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).

Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 213-244.

Rasola A, Fassetta M, De BF, D'Alessandro L, Gramaglia D, Di Renzo MF, Comoglio PM (2007). A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and beta-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. *Oncogene* 26, 1078-1087.

Reardon DA, Cloughesy TF, Raizer JJ, Laterra J, Schiff D, Yang X, Loh E, Wen PY. Phase II study of AMG 102, a fully human neutralizing antibody against hepatocyte growth factor/scatter factor, in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *ASCO Meeting Abstracts* 26 (May 20 suppl)[2051]. 20-5-2008.

Rehermann B, Nascimbeni M (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 215-229.

Reznik TE, Sang Y, Ma Y, Abounader R, Rosen EM, Xia S, Laterra J (2008). Transcription-dependent epidermal growth factor receptor activation by hepatocyte growth factor. *Mol. Cancer Res.* 6, 139-150.

Roth W, Weller M (1999). Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 481-506.

Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim. Biophys. Acta* 1155, 357-371.

Ruiz C, Huang W, Hegi ME, Lange K, Hamou MF, Fluri E, Oakeley EJ, Chiquet-Ehrismann R, Orend G (2004). Growth promoting signaling by tenascin-C

[corrected]. *Cancer Res.* 64, 7377-7385.

Sablotzki A, Ebel H, Muhling J, Dehne MG, Nopens H, Giesselmann H, Hempelmann G (2000). Dysregulation of immune response following neurosurgical operations. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44, 82-87.

5 Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwarra Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K (2007). Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. *J Neurooncol.* 82, 193-198.

10 Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, Furley AJ, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason CA, Grumet M (2001). Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J Cell Biol.* 154, 1259-1273.

Sakurai T, Lustig M, Nativ M, Hemperly JJ, Schlessinger J, Peles E, Grumet M (1997). Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. *J Cell Biol.* 15 136, 907-918.

Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA (2002). Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol.* 104, 105-109.

20 Sato F, Abraham JM, Yin J, Kan T, Ito T, Mori Y, Hamilton JP, Jin Z, Cheng Y, Paun B, Berki AT, Wang S, Shimada Y, Meltzer SJ (2006). Polo-like kinase and survivin are esophageal tumor-specific promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 465-471.

25 Schmidt C, Blatt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.

Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H, Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Storkel S, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* 16, 68-73.

35 Schmidt L, Junker K, Weirich G, Glenn G, Choyke P, Lubensky I, Zhuang Z, Jeffers M, Vande WG, Neumann H, Walther M, Linehan WM, Zbar B (1998). Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res.* 58, 1719-1722.

- Sehgal A, Boynton AL, Young RF, Vermeulen SS, Yonemura KS, Kohler EP, Aldape HC, Simrell CR, Murphy GP (1998). Cell adhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors. *Int J Cancer* 76, 451-458.
- Sehgal A, Ricks S, Warrick J, Boynton AL, Murphy GP (1999). Antisense human neuroglia related cell adhesion molecule hNr-CAM, reduces the tumorigenic properties of human glioblastoma cells. *Anticancer Res.* 19, 4947-4953.
- Seyfried TN (2001). Perspectives on brain tumor formation involving macrophages, glia, and neural stem cells. *Perspect. Biol. Med* 44, 263-282.
- Shimizu F, Watanabe TK, Shinomiya H, Nakamura Y, Fujiwara T (1997). Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochim. Biophys. Acta* 1354, 24-28.
- Sitnikova L, Mendese G, Liu Q, Woda BA, Lu D, Dresser K, Mohanty S, Rock KL, Jiang Z (2008). IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 14, 1701-1706.
- Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB (2004). Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem.* 50, 1986-1993.
- Stoeckli ET, Landmesser LT (1995). Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14, 1165-1179.
- Sun Y, Song M, Stevanovic S, Jankowiak C, Paschen A, Rammensee HG, Schadendorf D (2000). Identification of a new HLA-A(*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int. J. Cancer* 87, 399-404.
- Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R, Wiese D, Tanaka M, Kuo C, Wang HJ, Hoon DS (2003). c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res.* 9, 1480-1488.
- Tan HY, Liu J, Wu SM, Luo HS (2005). Expression of a novel apoptosis inhibitor-survivin in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 11, 4689-4692.
- Trusolino L, Comoglio PM (2002). Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 289-300.
- Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, Liao LM, Cloughesy TF, Nelson SF (2006). Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res.* 66, 159-167.
- Tuck AB, Park M, Stems EE, Boag A, Elliott BE (1996). Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 148, 225-232.

- Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, Nishimaki K, Matsumoto K, Takahashi H, Asoh S, Teramoto A, Ohta S (2005). Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. *J Neurooncol.* 72, 231-238.
- 5 van der Voort R, Taher TE, Keehnen RM, Smit L, Groenink M, Pals ST (1997). Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-hepatocyte growth factor/scatter factor pathway. *J Exp. Med* 185, 2121-2131.
- Veerkamp JH, Zimmerman AW (2001). Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *J Mol. Neurosci.* 16, 133-142.
- 10 Viapiano MS, Bi WL, Piepmeier J, Hockfield S, Matthews RT (2005). Novel tumor-specific isoforms of BEHAB/brevican identified in human malignant gliomas. *Cancer Res.* 65, 6726-6733.
- Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT (2008). BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *J Neurooncol.*
- 15 Viapiano MS, Matthews RT (2006). From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol. Med* 12, 488-496.
- Volkmer H, Leuschner R, Zacharias U, Rathjen FG (1996). Neurofascin induces neurites by heterophilic interactions with axonal NrCAM while NrCAM requires F11 on the axonal surface to extend neurites. *J Cell Biol.* 135, 1059-1069.
- 20 Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* 171, 4974-4978.
- Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R (2005). Differential gene upregulation by hypoxia-inducible factor-1 α and hypoxia-inducible factor-2 α in HEK293T cells. *Cancer Res.* 65, 3299-3306.
- 25 Wiranowska M, Ladd S, Smith SR, Gottschall PE (2006). CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of glioma. *Brain Cell Biol.* 35, 159-172.
- 30 Wu CW, Kao HL, Li AF, Chi CW, Lin WC (2006). Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues. *Cancer Lett.* 242, 95-103.
- Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, Guan XY (2006). Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br. J Cancer* 94, 108-114.
- 35 Yamashita S, Masuda Y, Kurizaki T, Haga Y, Murayama T, Ikei S, Kamei M, Takeno S, Kawahara K (2007). Survivin expression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. *Anticancer Res.* 27, 2803-2808.

- Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA, McCarthy JB (2004). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol.* 165, 881-891.
- 5 Yantiss RK, Cosar E, Fischer AH (2008). Use of IMP3 in identification of carcinoma in fine needle aspiration biopsies of pancreas. *Acta Cytol.* 52, 133-138.
- Yantiss RK, Woda BA, Fanger GR, Kalos M, Whalen GF, Tada H, Andersen DK, Rock KL, Dresser K (2005). KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer): a novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 29, 188-195.
- 10 Zacharias U, Norenberg U, Rathjen FG (1999). Functional interactions of the immunoglobulin superfamily member F11 are differentially regulated by the extracellular matrix proteins tenascin-R and tenascin-C. *J Biol. Chem.* 274, 24357-24365.
- Zarnegar R, Michalopoulos GK (1995). The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J. Cell Biol.* 129, 1177-1180.
- 15 Zeng Z, Weiser MR, D'Alessio M, Grace A, Shia J, Paty PB (2004). Immunoblot analysis of c-Met expression in human colorectal cancer: overexpression is associated with advanced stage cancer. *Clin Exp. Metastasis* 21, 409-417.
- Zhang H, Kelly G, Zerillo C, Jaworski DM, Hockfield S (1998). Expression of a cleaved brain-specific extracellular matrix protein mediates glioma cell invasion In vivo. *J Neurosci.* 18, 2370-2376.
- 20 Zhen HN, Zhang X, Hu PZ, Yang TT, Fei Z, Zhang JN, Fu LA, He XS, Ma FC, Wang XL (2005). Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer* 104, 2775-2783.
- 25 Zheng W, Yi X, Fadare O, Liang SX, Martel M, Schwartz PE, Jiang Z (2008). The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 32, 304-315.
- Ziu M, Schmidt NO, Cargioli TG, Aboody KS, Black PM, Carroll RS (2006). Glioma-produced extracellular matrix influences brain tumor tropism of human neural stem cells. *J Neurooncol.* 79, 125-133.
- 30

Patentkrav

1. Farmasøytisk sammensetning omfattende et peptid som består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO 2, og et peptid som består av aminosyresekvensen til SEQ ID NO 3, og en farmasøytisk akseptabel bærer.
2. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 1, ytterligere omfattende minst ett ytterligere peptid som består av en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO 1 og SEQ ID NO 4 til SEQ ID NO 12.
3. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 1 eller 2, der det minst ene peptidet inkluderer ikke-peptidbindinger.
4. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 1 til 3, der valget, antallet og/eller mengden av peptider til stede i sammensetningen er vev-, kreft- og/eller pasientspesifikt.
5. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, videre omfattende minst en egnet adjuvans, valgt fra gruppen omfattende 1018 ISS, aluminiumsalter, Amplivax, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISCOMATRIX, JuvImmune, Lipovac, MF59, monofosforyllipid A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PepTel-vektorsystem, PLG-mikropartikler, resiquimod, SRL172, virosomer og andre viruslignende partikler, YF-17DBCG, Aquilas QS21 stimulon, Ribis Detox. Quil, Superfos, Friends, GM-CSF, koleratoksin, immunologiske adjuvanter, MF59 og cytokiner.
6. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 5, der adjuvansen velges fra gruppen som består av kolonistimulerende faktorer, så som granulocyttmakrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF), eller Imiquimod eller Resiquimod.
7. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, som i tillegg inneholder minst en antigenpresenterende celle.

8. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 7, der den antigenpresenterende cellen er en dendrittcelle.

9. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 7 eller 8, der den minst ene antigenpresenterende cellen er

a) pulset eller lastet med peptidet eller

b) omfatter en uttrykingskonstruksjon som koder for peptidet.

10. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, der sammensetningen er for intravenøs, intraarteriell, intraperitoneal, intramuskulær, intradermal, intratumoral, oral, dermal, nasal, bukkal, rektal, vaginal, ved inhalering eller topisk administrering.

11. En terapeutisk effektiv mengde av den farmasøytiske sammensetningen ifølge hvilket som helst av de foregående kravene for anvendelse ved behandling eller forebygging av kreft i en pasient.

12. Den farmasøytiske sammensetningen for anvendelse ifølge krav 11, som er en anti-kreftvaksine.

13. Den farmasøytiske sammensetningen for anvendelse ifølge krav 12, der kreften er kreft i munnhulen og svelget, kreft i fordøyelseskanalen, kreft i tykktarmen, rektum og anus, kreft i luftrøret, brystkreft, livmorhalskreft, vagina og vulva, livmor- og eggstokkreft, kreft i det mannlige kjønnsorganet, kreft i urinveiene, kreft i ben og mykt vev, og Kaposi sarkom, melanom i huden, øyemelanom, og ikke-melanomøyekreft, kreft i hjernen og sentralnervesystemet, kreft i skjoldbruskkjertelen og andre endokrine kjertler, Hodgkins lymfom, ikke-Hodgkins lymfom og myelom, så som nyrekreft, kolorektalkreft, lungekreft, brystkreft, pankreatisk kreft, prostatakreft, magekreft, GIST eller glioblastom.

14. Den farmasøytiske sammensetningen for anvendelse ifølge krav 13, der kreften er kolorektal kreft.

Sekvensliste

```

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Sammensetning av tumorassosierte peptider og beslektet antikreftvaksine
      for behandling av glioblastom (GBM) og andre kreftformer

<130> FB20731

<160> 13

<170> PatentIn version 3.4

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

<400> 1

Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala
1              5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Thr Phe Gly Asp Val Val Ala Val
1              5

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

<400> 3

Asn Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val
1              5

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

<400> 4

Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val
1              5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```

Gly Leu Trp His His Gln Thr Glu Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Leu Trp Ala Trp Pro Ser Glu Leu
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr
1 5 10 15

Gly

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

<400> 9

Ala Ile Ile Asp Gly Val Glu Ser Val
1 5

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

<400> 10

Lys Val Phe Ala Gly Ile Pro Thr Val
1 5

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

<400> 11

Ser Leu Trp Ala Gly Val Val Val Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

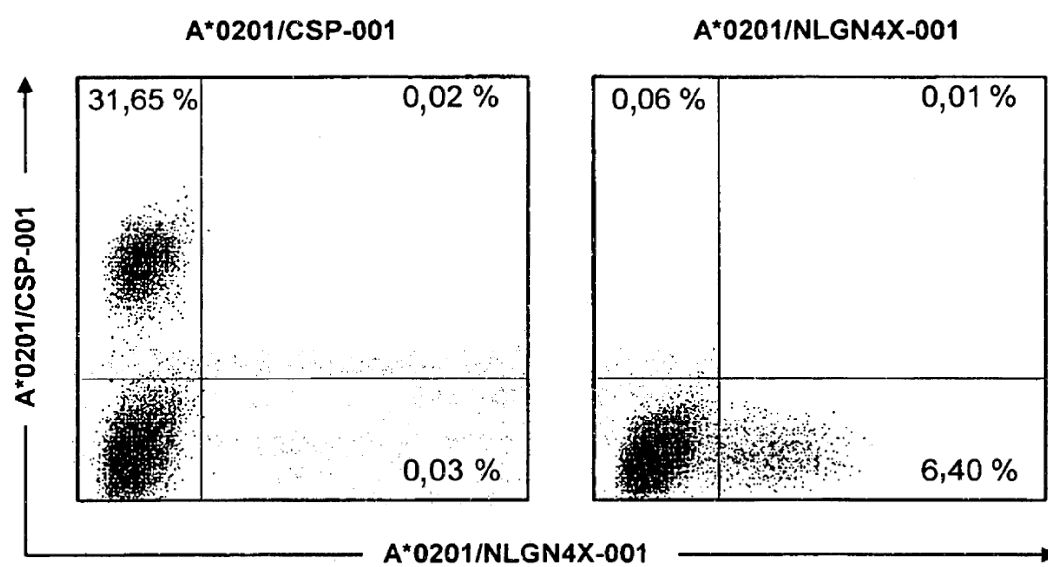
Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

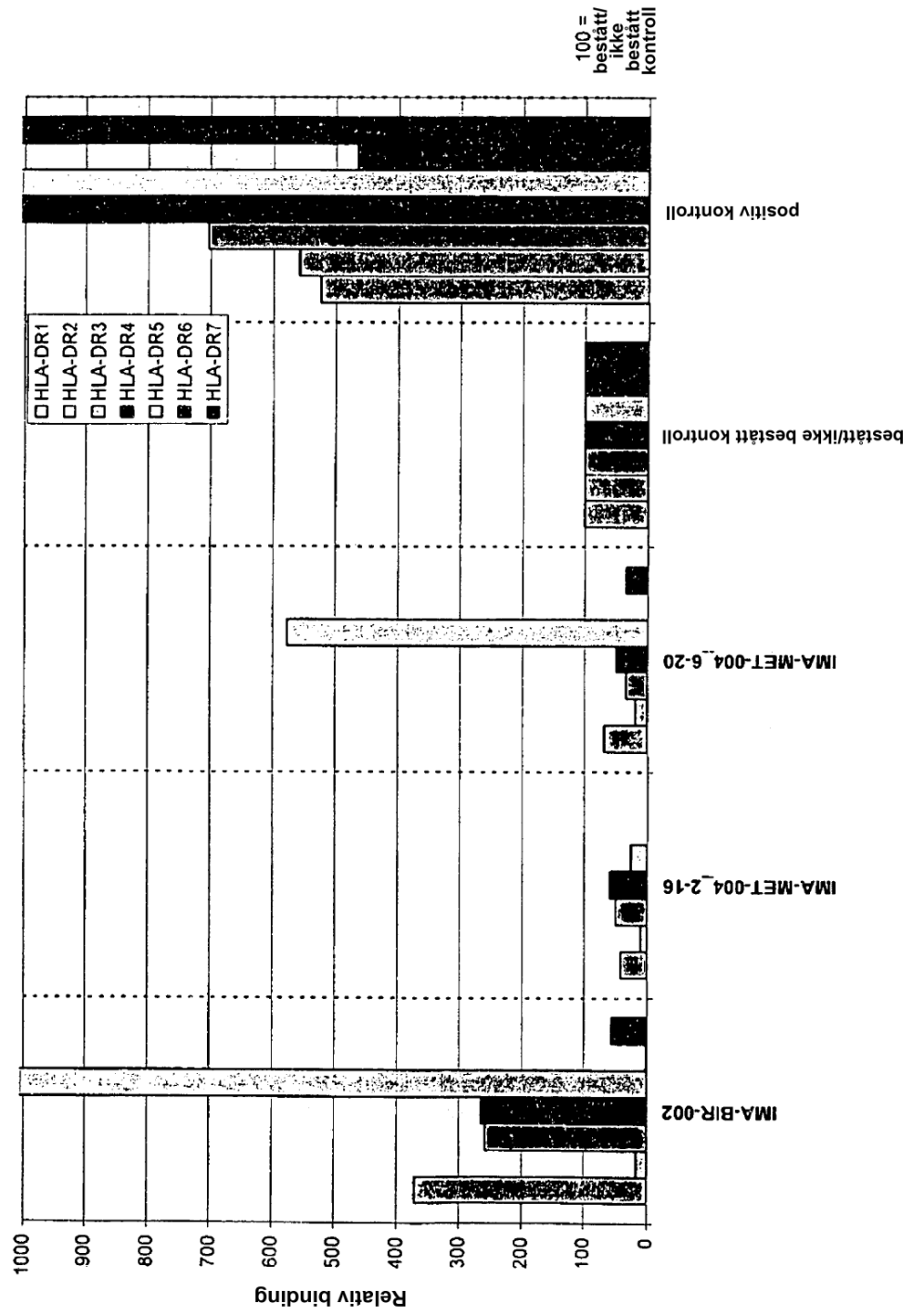
<400> 13

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val
 1 5 10

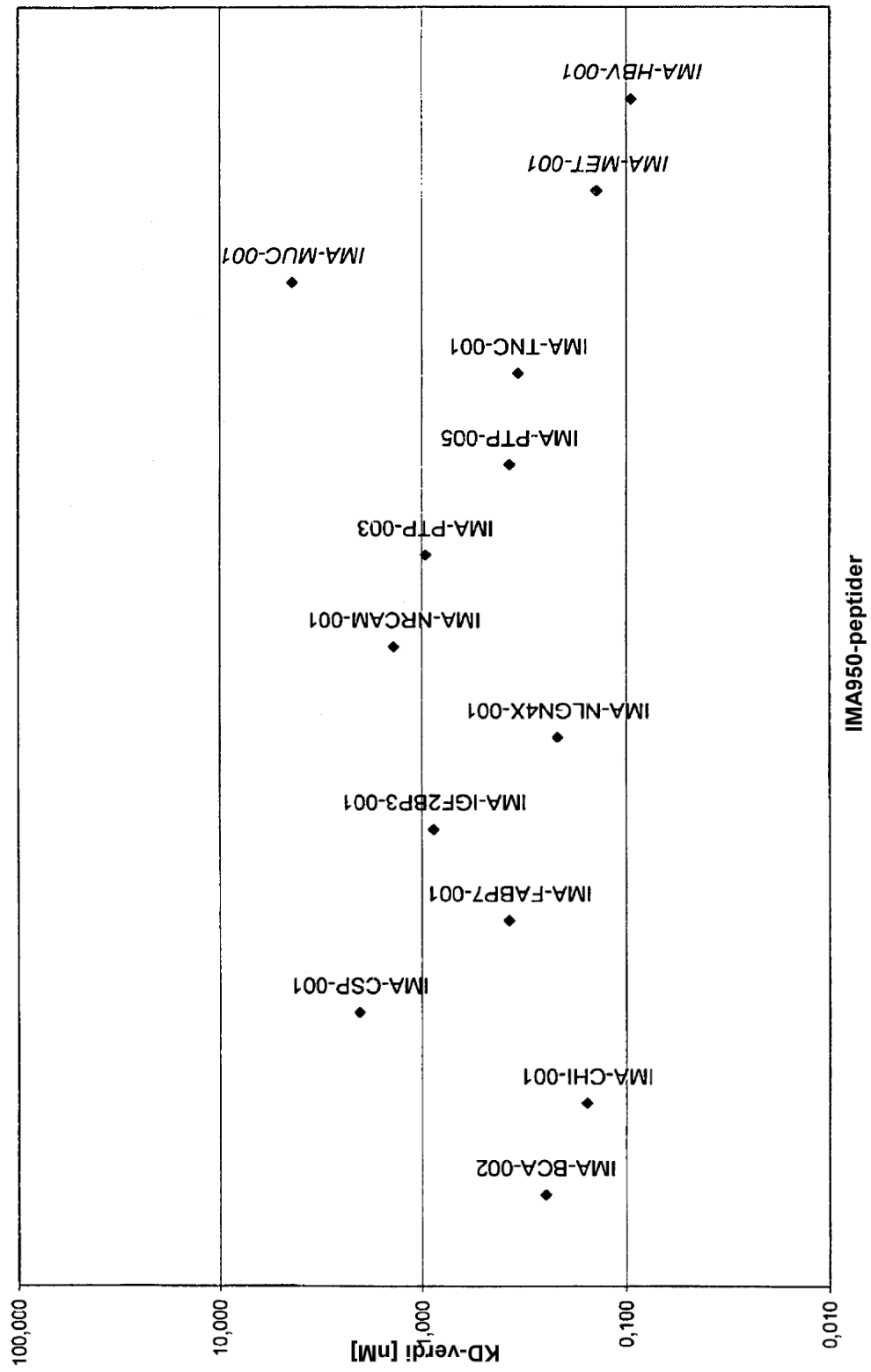
Figur 1: Eksemplarisk *in vitro*-immunogenisitet av IMA950-TUMAP-er av klasse I



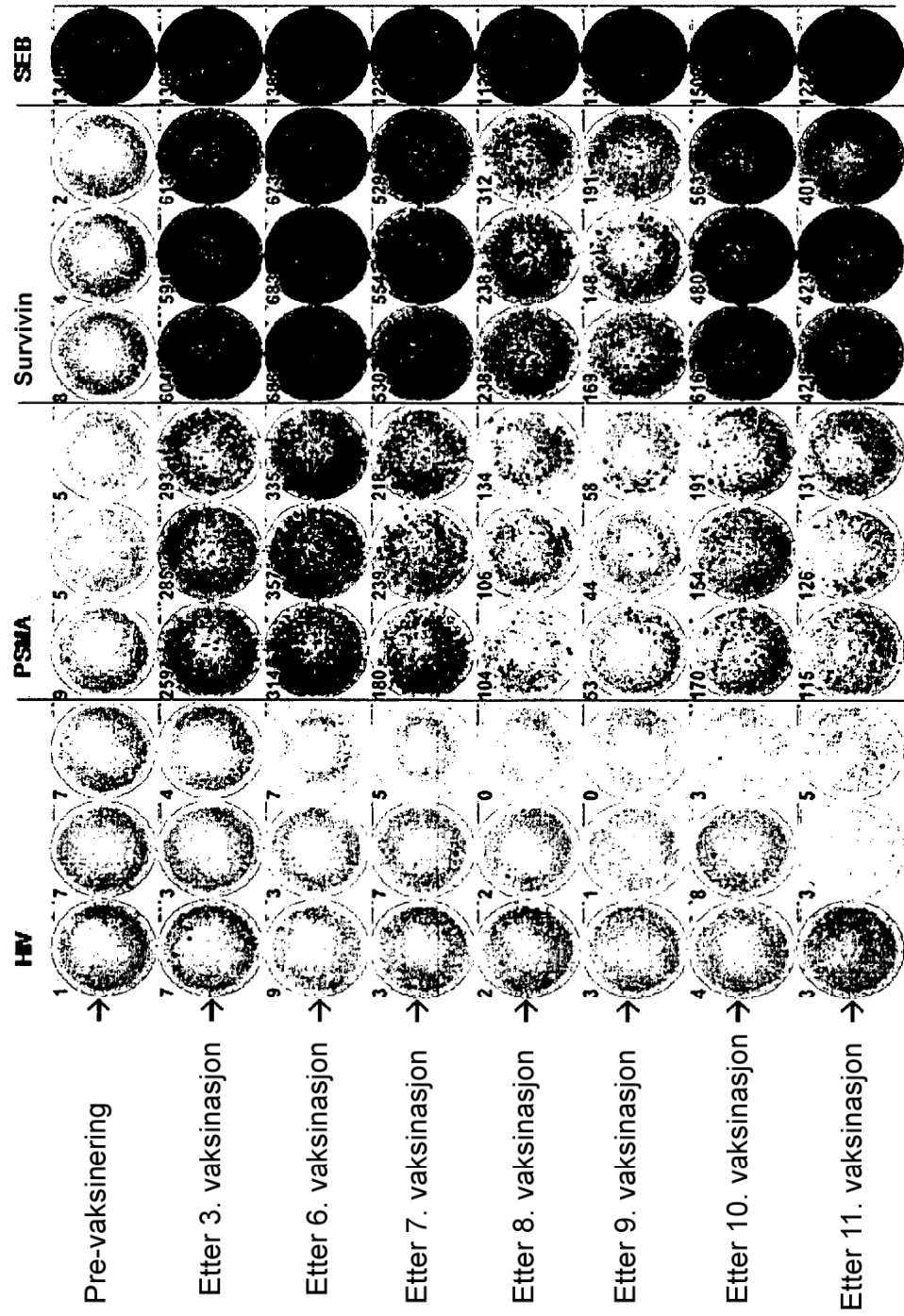
Figur 2: *In vitro*-binding av peptider av IMA950 klasse II til HLA-DR-alleler



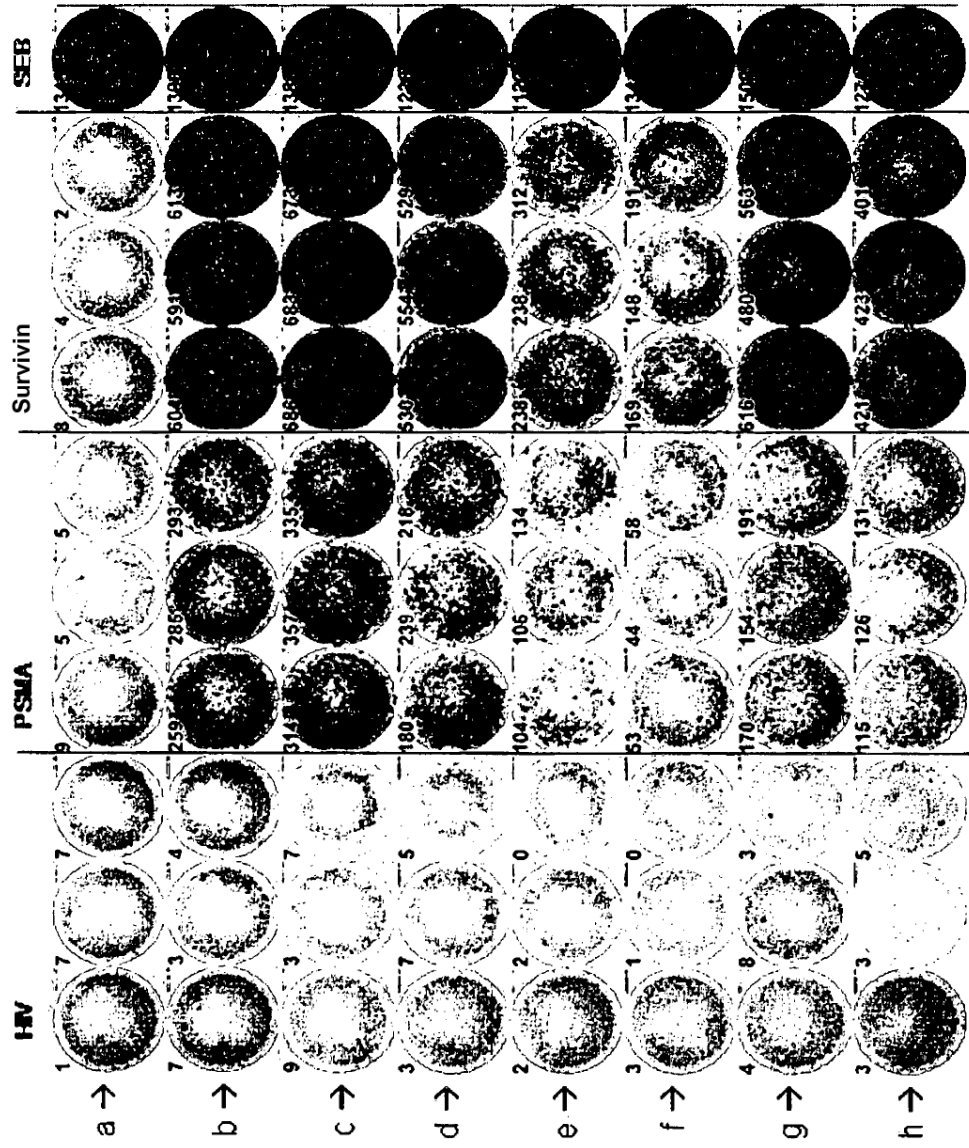
Figur 3: *In vitro*-bindingsaffiniteter for TUMAP-er av IMA950 klasse I til A *02



Figur 4: gamma-interferon-ELISpot



Figur 4b: gamma-interferon-ELISpot



Figur 5

