



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122047** (13) **C2**  
(51) МПК (2020.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2015 12437</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Вейншенк Тоні (DE), Фрітше Йенс (DE), Вальтер Штеффен (DE), Левандровскі Петер (DE), Зінгх Харпреет (DE)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>15.03.2011</b>	(73) Власник(и):	<b>ІММАТІКС БІОТЕКНОЛОДЖІС ГМБХ, Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany (DE)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>11.09.2020</b>	(74) Представник:	<b>Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>1004551.6, 61/315,704</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 0220036 A1, 14.03.2002 EP 2111867 A1, 28.10.2009 EP 2043679 A2, 08.04.2009 WO 2009015841 A1, 05.02.2009 WEINSCHENK T. et al. Integrated functional genomics approach for the design of patient- individual antitumor vaccines. Cancer research, American association for cancer research, US, 2002, Vol. 62, no. 20, P. 5818 – 5827</b>
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>19.03.2010, 19.03.2010</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>GB, US</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>25.05.2016, Бюл.№ 10</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.09.2020, Бюл.№ 17</b>		
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	<b>, а201209114, 15.03.2011</b>		

## (54) ЗАСТОСУВАННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ, ЩО МІСТИТЬ ПЕПТИД, ЯК ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЗНИЩЕННЯ КЛІТИН-МІШЕНЕЙ В ОРГАНІЗМІ ПАЦІЄНТА

### (57) Реферат:

Винахід стосується застосування пептиду, нуклеїнової кислоти та клітини для імунотерапії. Зокрема, цей винахід стосується імунотерапії раку. Цей винахід має також відношення до епітопів пухлино-асоційованих пептидів цитотоксичних Т-клітин (ЦТЛ), які самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованих пептидами служать активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції. Цей винахід стосується нових пептидних послідовностей та їх варіантів, отриманих із молекул HLA I класу клітин пухлин людини, які можуть використовуватись у вакцинних композиціях з метою викликати протипухлинну імунну відповідь.

UA 122047 C2



Цей винахід стосується пептидів, нуклеїнових кислот та клітин для їх використання в імунотерапії. Зокрема, цей винахід стосується імунотерапії раку. Цей винахід має також відношення до епігонів пухлино-асоційованих пептидів, що розпізнаються CD8-позитивними Т-клітинами, самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованими пептидами, котрі

служать активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції. Цей винахід стосується 33 нових пептидних послідовностей та їх варіантів, отриманих із молекул HLA I класу клітин пухлин людини, які можуть застосовуватися у вакцинних композиціях з метою викликати протипухлинну імунну відповідь, особливо відповідь цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ). Передумова створення винаходу

Рак шлунка з захворюванням, за якого у слизовій оболонці шлунка утворюються злоякісні клітини. Рак шлунка може розвиватися в будь-якій частині шлунка і може розповсюджуватися на весь шлунок і на інші органи, особливо стравохід, легені та печінку. Рак шлунка є четвертим по захворюваності видом раку на земній кулі: 930 000 випадків діагностували в 2002 році. Він є захворюванням з високим рівнем смертності (~800 000 щорічно), що робить його другою за кількістю серед усіх видів раку причиною смерті на земній кулі після раку легенів. Він більш поширений серед чоловіків і частіше спостерігається в країнах Азії та у країнах, що розвиваються. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.)

Він щороку становить приблизно 2 % (25 500 випадків) від нових випадків раку в Сполучених Штатах, але він більш поширений в інших країнах. Він займає перше місце серед усіх видів раку в Кореї, де складає 20,8 % злоякісних новоутворень. У Японії рак шлунка залишається найбільш поширеним видом раку серед чоловіків. Щорічно у Сполучених Штатах у приблизно 13 000 чоловіків і у 8000 жінок діагностують рак шлунка. Більшість з них старіше 70 років. Рак шлунка є четвертим по захворюваності видом раку на земній кулі після раку легенів, молочної залози, товстої кишки та прямої кишки. До того ж, рак шлунка залишається другою за поширеністю причиною смерті від раку. За оцінкою Американського онкологічного товариства, у 2007 році було близько одного мільйону нових випадків захворювання на рак, приблизно 70 % у країнах, що розвиваються, і близько 800 000 смертей ([http://www.cancer.org/downloads/STT/Global\\_Facts\\_and\\_Figures\\_2007\\_rev2.pdf](http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Facts_and_Figures_2007_rev2.pdf)).

Існує величезна географічна різниця у захворюваності цією хворобою в усьому світі. Захворюваність є найвищою в Азії та в деяких частинах Південної Америки і найнижчою - у Північній Америці. Найвища смертність зареєстрована у Чилі, Японії, Південній Америці та в країнах колишнього Радянського Союзу.

Рак шлунка часто діагностується на пізніх стадіях, оскільки скринінг у більшості країн світу не проводиться, за виключенням Японії (та у обмежений спосіб у Кореї), де часто спостерігається раннє виявлення. Таким чином, він продовжує становити головний виклик для професіоналів в охороні здоров'я. Факторами ризику раку шлунка є інфекція *Helicobacter pylori* (H. pylori), паління, дієта з високим вмістом солі та інші дієтичні фактори. Деяка кількість випадків раку (від 1 до 3 %) пов'язана зі спадковою схильністю до раку шлунка. Мутації гена E-cadherin виникають приблизно у 25 % сімей із аутосомно-домінантним типом успадкування раку шлунка дифузного типу. Цей різновид раку шлунка отримав назву сімейного дифузного раку шлунка.<sup>12</sup> Може виявитися корисним провести медико-генетичне консультування і розглянути доцільність профілактичної гастректомії у молодих асимптоматичних носіїв усіченої форми гена.

Стінка шлунка складається з трьох тканинних шарів: шару (найглибшого) слизової оболонки, м'язового (середнього) шару і серозного (зовнішнього) шару. Ракова пухлина шлунка виникає у клітинах, що вистилають м'язовий шар, і поширюється крізь зовнішні шари з ростом пухлини. Використовують чотири види стандартного лікування. Лікування раку шлунка може включати хірургію, хіміотерапію, променеву терапію або хіміопроменеву терапію. Хірургія є головним методом лікування раку шлунка. Метою хірургічного втручання є повне видалення шлунка з гістологічно негативними краями резекції (радикальна, або R0-резекція). Однак приблизно 50 % пацієнтів із місцево поширеним раком шлунка не підлягають R0-резекції. R1 вказує на те, що резидуальну пухлину визначають мікроскопічно (позитивний край), а R2 свідчить про те, що резидуальну пухлину діагностують макроскопічно, але метастазів немає. Результати лікування для пацієнта залежить від стадії раку в той час, коли його діагностували (Настанови з клінічної практики в онкології™ Національної мережі NCCN).

5-річна виживаність для куративної хірургічної резекції лежить у діапазоні 30-50 % у пацієнтів з II стадією захворювання і 10-25 % у пацієнтів з III стадією захворювання. У цих пацієнтів існує висока ймовірність місцевого і системного рецидиву. Метастази виникають у 80-90 % суб'єктів із раком шлунка, а шестимісячна виживаність становить 65 % у пацієнтів з ранніми стадіями і менше ніж 15 % у пацієнтів, яким діагностовані пізні стадії.

Таким чином, залишається потреба у нових ефективних і безпечних методах лікування раку шлунка, карциноми передміхурової залози, карцином порожнини рота, плоскоклітинного раку порожнини рота (OSCC), гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ), пов'язаної з H. Pylori MALT-лімфоми, карциноми товстої кишки/колоректального раку, гліобластоми, недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), карциноми шийки матки, раку молочної залози людини, раку передміхурової залози, раку товстої кишки, раку підшлункової залози, аденокарциноми протоків підшлункової залози, раку яєчника, гепатоцелюлярної карциноми, раку печінки, пухлин мозку різних фенотипів, лейкемій таких як гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ), раку легенів, саркоми Юінга, раку ендометрію, плоскоклітинного раку голови та шиї, епітеліального раку гортані, езофагеальної карциноми, карциноми порожнини рота, карциноми сечового міхура, карцином яєчника, нирково-клітинної карциноми, атипової менінгіоми, папілярної карциноми щитоподібної залози, пухлин мозку, карцином слинних протоків, раку шийки матки, екстранодальних лімфом T/NK-клітин, неходжкінської лімфоми та злоякісних солідних пухлин легенів і молочної залози та інших пухлин, які сприятимуть покращенню стану пацієнтів без використання хіміотерапевтичних засобів та інших засобів, що можуть призвести до серйозних побічних ефектів.

Цей винахід стосується пептидів, які стимулюють імунну систему та діють як протипухлинні препарати у неінвазивний спосіб.

Коротке формулювання суті винаходу

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

Специфічні елементи клітинного імунного відгуку здатні специфічно розпізнавати та знищувати пухлинні клітини. Виділення цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) із популяції пухлино-інфільтруючих клітин або з периферичної крові говорить про те, що такі клітини відіграють важливу роль у природному імунному захисті проти раку. Особливо важливу роль у цій відповіді відіграють, зокрема, СО8-позитивні Т-клітини (ТCD8<sup>+</sup>), які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності I класу (МНС). Ці пептиди складаються з 8-10 амінокислотних залишків, що отримані з білків або дефектних рибосомних продуктів (DRIP), які містяться у цитозолі. Молекули МНС людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

Існує два класи молекул МНС. Молекули МНС I класу можна виявити в більшості клітин, що мають ядро. Молекули МНС складаються з альфа-важких ланцюгів і бета-2-мікроглобуліну (рецептори молекул МНС I класу) або альфа- і бета-ланцюгів (рецептори молекул МНС II класу), відповідно. Їхня тримірна конформація приводить до утворення зв'язувальної щілини, що використовується для нековалентної взаємодії з пептидами. Молекули МНС I класу презентують пептиди, які утворюються в результаті розщеплення протеолітичними ферментами переважно ендогенних білків, продуктів DRIP та більш великих пептидів. Молекули МНС II класу містяться головним чином в професійних антигенпрезентуючих клітинах (АПК). Вони головним чином презентують пептиди екзогенних або трансмембранних білків, які поглинаються клітинами АПК в ході ендоцитозу, і проходять подальше трансформування. Комплекси пептидів і молекул МНС I класу розпізнаються СО8-позитивними цитотоксичними Т-лімфоцитами, що несуть відповідні Т-клітинний рецептор (ТКР), в той час як комплекси пептиду і молекул МНС II класу розпізнаються СО4-позитивними Т-хелперами, що несуть відповідний ТКР. Загальновідомо, що ТКР, пептид і МНС, таким чином, є присутніми у стехіометричних кількостях при співвідношенні 1:1:1.

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

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

Антигенами, які розпізнаються пухлино-специфічними ЦТЛ, тобто їхніми епітопами, можуть бути молекули, що отримані з усіх класів білків, таких як ферменти, рецептори, фактори

транскрипції тощо, які експресуються і, у порівнянні з незміненими клітинами того ж походження, активовані у клітинах відповідної пухлини.

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

а) Раково-тестикулярні антигени: Перші будь-коли ідентифіковані ТАА, які можуть бути розпізнані Т-клітинами, належать до цього класу, які були спочатку названі раково-тестикулярними (СТ) антигенами завдяки експресії його представників у гістологічно різних пухлинах людини і, поряд із нормальними тканинами, тільки в сперматocyтах/сперматогоніальних клітинах яєчок і іноді в плаценті. Оскільки клітини яєчок не експресують молекули HLA I та II класу, ці антигени не можуть розпізнаватися Т-клітинами у нормальних тканинах і можуть, таким чином, вважатися пухлинно-специфічними, з точки зору імунології. Добре відомими прикладами СТ антигенів є члени сімейства MAGE або NY-ESO-1.

б) Антигени диференціації: Ці ТАА розподілені між пухлинами та нормальними тканинами, з яких виникла пухлина, більшість з них знайдена в меланомах і нормальних меланоцитах. Багато цих меланоцитарних білків задіяні у біосинтезі меланіну і тому не є пухлинно-специфічними, але, тим не менше, широко застосовуються для імунотерапії раку. Приклади включають, але не обмежуються ними, тирозиназу і Melan-A/MART-1 для меланоми або PSA для раку передміхурової залози.

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

г) Пухлино-специфічні антигени: Ці унікальні ТАА утворюються в результаті мутацій нормальних генів (таких як бета-катенін, CDK4 тощо). Деякі з цих молекулярних змін зв'язані з неопластичною трансформацією та/або пухлинною прогресією. Пухлино-специфічні антигени загалом можуть викликати сильні імунні відповіді, не спричиняючи ризику аутоімунних реакцій проти нормальних тканин. З іншого боку, ці ТАА у більшості випадків мають відношення тільки до певної пухлини, на якій вони були ідентифіковані, і зазвичай не розподіляються між багатьма окремими пухлинами.

е) ТАА, що виникають в результаті аномалій у посттрансляційних модифікаціях. Такі ТАА можуть виникати з білків, які не є ні специфічними, ні надмірно експресованими у пухлинах, але, незважаючи на це, стають асоційованими в результаті посттрансляційних процесів, первинно активних у пухлинах. Прикладами ТАА цього класу є антигени, що виникають в результаті змін характеру гликозилування, що приводить до утворення у пухлинах нових епітопів, таких як MUC1, або таких подій як білковий сплайсинг під час деградації, які можуть бути пухлино-специфічними, а можуть і не бути, ф) Онковірусні білки: Ці ТАА є вірусними білками, які можуть відігравати вирішальну роль в онкогенному процесі і, оскільки вони є чужорідними (не походять від людини), вони можуть викликати відповідь Т-клітин. Прикладами таких білків є білки вірусу папіломи людини типу 16, Е6 і Е7, які експресуються клітинами карциноми шийки матки.

Для того, щоб білки розпізнавалися цитотоксичними Т-лімфоцитами як пухлино-специфічні або пухлино-асоційовані антигени, та щоб їх було можливо застосовувати в терапії, необхідно створити особливі передумови. Антиген має експресуватися, головним чином, пухлинними клітинами і не експресуватися або експресуватися у порівняно невеликих кількостях нормальними здоровими тканинами. До того ж бажано, щоб відповідний антиген не тільки був присутнім у пухлині певного виду, але також у високих концентраціях (тобто, як декілька копій відповідного пептиду на клітину). Пухлино-специфічні та пухлино-асоційовані антигени часто отримують із білків, які беруть безпосередню участь у трансформації нормальної клітини в пухлинну клітину, завдяки їх функції, наприклад, в контролі клітинного циклу або пригніченні апоптозу. Крім цього, низхідні мішені білків, що є безпосередньою причиною трансформації, можуть мати підвищену експресію і, таким чином, можуть бути опосередковано пухлино-асоційованими. Такі опосередковані пухлино-асоційовані антигени можуть бути мішенями вакцинаційного підходу (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). У обох випадках важливим є те, щоб в амінокислотній послідовності антигену були присутні епітопи, оскільки такий пептид ("імуногенний пептид"), отриманий із пухлино-асоційованого антигену, має приводити до відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

По суті, будь-який пептид, що здатний зв'язуватися з молекулою МНС, може функціонувати як епітоп Т-клітини. Передумовою індукції відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo* є присутність Т-клітин із відповідним Т-клітинним рецептором і відсутність імунологічної толерантності до цього окремого епітопу.

5 Таким чином, ТАА є стартовою точкою для розробки протипухлинних вакцин. Методи ідентифікації та визначення характеристик ТАА базуються на використанні ЦТЛ, які можна виділити з організму пацієнтів або здорових суб'єктів, або вони ґрунтуються на генерації різних профілів транскрипції або різному характері експресії пептидів тканинами пухлин і нормальними тканинами.

10 Проте ідентифікація генів, які надмірно експресуються пухлинними тканинами або лініями клітин пухлин людини, або селективно експресуються в таких тканинах або клітинних лініях, не дає точної інформації щодо застосування антигенів, що транскрибуються цими генами, в імунній терапії. Причиною цього є те, що тільки окрема субпопуляція епітопів цих антигенів придатна для такого застосування, оскільки має бути присутня Т-клітина з відповідним ТКР і імунологічна толерантність відносно цього епітопу повинна бути відсутньою або мінімальною. 15 Таким чином, важливо вибрати тільки такі пептиди з надмірно експресованих або селективно експресованих білків, які презентуються зв'язаними з молекулами МНС, проти яких можливо знайти функціонуючу Т-клітину. Така функціонуюча Т-клітина визначається як Т-клітина, яка при стимуляції специфічним антигеном може бути клонована і здатна виконувати функції ефектора (ефекторна Т-клітина).. 20

Т-хелперні клітини відіграють важливу роль в регуляції ефекторної функції ЦТЛ у протипухлинному імунітеті. Епітопи Т-хелперів, які запускають реакцію цих клітин типу Т<sub>H1</sub>, підтримують ефекторні функції CD8-позитивних Т-кілерів, котрі включають цитотоксичні функції, спрямовані проти клітин пухлини, що експресують комплекси пухлино-асоційованого пептиду/МНС на поверхнях своїх клітин. У такий спосіб епітопи пухлино-асоційованих пептидів Т-клітин-хелперів, самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованих пептидами, 25 можуть служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції.

Фігура 1: Зразок мас-спектра CDC2-001, що демонструє його презентацію на зразку первинної пухлині GC2464. Дослідження за допомогою РХ-МС із системою іонізації у наноелектроспреї було проведено на пулі пептидів, що був елюйований із РХ зразка 2464. Мас-хроматограма для  $m/z$  597,3501  $\pm$  0,001 Да,  $z = 2$  містить пік пептидів із часом утримання 151,63 хв. В). Виявлений пік на мас-хроматограмі при 151.63 хв. відповідає сигналу для  $m/z$  597,3501 на спектрі МС. С) Мас-спектр з індукованою зіткненнями дисоціацією вибраного прекурсора з  $m/z$  597,3501, записаний в експерименті на РХ-МС системі іонізації у наноелектроспреї при даному часі утримання, підтвердив присутність CDC2-001 у зразку пухлини GC2464. D) Був записаний шаблон фрагментації синтетичного контрольного пептиду CDC2-001. Було 35 проведено його порівняння з отриманим шаблоном фрагментації природного пухлино-асоційованого пептиду (TUMAP), наведеним на фіг. С для верифікації послідовності.

40 Фігура 2: Профілі експресії мРНК вибраних білків в нормальних тканинах і в 25 зразках тканин раку шлунка

а) CDC2 (Ідентифікатор набору проб: 203213\_at),

б) ASPM (Ідентифікатор набору проб: 219918\_s\_at).

Фігура 3: Приклади результатів для пептид-специфічної імуногенності *in vitro* для TUMAP 45 класу I. СО8-позитивні Т-клітини були примовані з використанням штучних АПК, навантажених відповідним (ліва панель) і невідповідним (права панель) пептидом, у вказаному порядку. Після трьох циклів стимуляції були проведені визначення клітин, що реагують із пептидом, за допомогою подвійного фарбування з відповідними та невідповідними А\*2402-мультимерами. Серед показаних клітин проводиться "гейтування" живих CD8<sup>+</sup> лімфоцитів, і цифри на графіку 50 відображають відсоткові частки мультимер-позитивних клітин.

Якщо не зазначено інше, під нижче наведеними термінами, що використовуються у цьому описі, розуміються наступні поняття. Термін "пептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані одне з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Бажано, щоб пептиди 55 були довжиною у 9 амінокислот, але можуть бути такими короткими, як довжиною у 8 амінокислот, і такими довгими, як довжиною у 10, 11, 12, 13 або 14 амінокислот.

Термін "олігопептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані одне з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина олігопептиду не критична для цього 60 винаходу за умови, що він містить правильний епітоп чи епітопи. Олігопептиди зазвичай

коротші, ніж довжиною близько 30 амінокислотних залишків, і довші, ніж довжиною близько 14 амінокислотних залишків.

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

Пептид, олігопептид, білок або полінуклеотид має назву "імуногенного" щодо такої молекули (і, отже, є "імуногеном" в межах цього винаходу), якщо він здатний індукувати імунну відповідь. У межах цього винаходу імуногенність точніше визначається як здатність викликати відповідь Т-клітин. Отже, "імуногеном" може бути молекула, яка здатна індукувати імунну відповідь, і що стосується цього винаходу, молекула, що здатна індукувати відповідь Т-клітин.

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

У людини є три різні генетичні локуси, які кодують молекули МНС І класу (молекули МНС людини мають також відношення до лейкоцитарних антигенів людини (HLA)): HLA-A, HLA-B і HLA-C. HLA-A\*01, HLA-A\*02 і HLA-A\*024 є прикладами різних алелів МНС І класу, які можуть експресуватися з цих локусів.

Таблиця 1:

Частоти експресії F для HLA\*A024 і найбільш поширених серотипів HLA\*A02402. Частоти отримані з частот виявлення галотипів G<sub>f</sub> серед населення США, адаптовано з публікації (Mori і співавт., 1017-27) з використанням формули Харді-Вайнберга:  $F=1-(1-G_f)^2$ . Детальну інформацію див. у (Chanock і співавт., 1211-23). Частоти експресії серотипів HLA\*24 і A\*2402 у всьому світі

Алель	Популяція	Фенотип, розрахований із частоти алелів
A*24	Філіппіни	65 %
A*24	Ненці Росії	61 %
A*2402	Японія	59 %
A*24	Малайзія	58 %
A*2402	Філіппіни	54 %
A*24	Індія	47 %
A*24	Південна Корея	40 %
A*24	Шрі-Ланка	37 %
A*24	Китай	32 %
A*2402	Індія	29 %
A*24	Західна Австралія	22 %
A*24	США	22 %
A*24	Росія, Самара	20 %
A*24	Південна Америка	20 %
A*24	Європа	18 %

Для цілей цього винаходу посилання на послідовність ДНК означає як одноланцюгову, так і дволанцюгову ДНК. Отже, конкретна послідовність, якщо контекст на вказує на інше, відноситься до одноланцюгової ДНК такої послідовності, дуплекса такої послідовності з її комплементом (дволанцюгова ДНК) і комплементу такої послідовності. Термін "кодуюча ділянка" належить до тієї частини гена, яка або природно, або нормально кодує продукт експресії цього гена в його природному геномному оточенні, тобто, до ділянки, що кодує *in vivo* природний продукт експресії гена.

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

Термін "нуклеотидна послідовність" відноситься до гетерополімеру дезоксирибонуклеотиду.

Нуклеотидна послідовність, що кодує конкретний пептид, олігопептид або поліпептид, може зустрічатися в природі або може бути сконструйована синтетично. Загалом, сегменти ДНК, які

кодують пептиди, поліпептиди та білки за цим винаходом, зібрані з фрагментів кДНК і коротких олігонуклеотидних лінкерів або з серії олігонуклеотидів з утворенням синтетичного гена, що здатний експресуватися в рекомбінантній транскрипційній одиниці, що містить регуляторні елементи, які отримані з оперона мікроорганізму або вірусу.

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

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

15 Термін "сегмент ДНК" відноситься до полімеру ДНК у формі окремого фрагмента чи як компонент більшої конструкції ДНК, що одержаний з ДНК, виділеної принаймні один раз по суті в чистій формі, тобто без забруднюючих ендегенних матеріалів та в кількості чи концентрації, яка дає змогу ідентифікувати, виконувати маніпуляції та відновлювати сегмент і його складові нуклеотидні послідовності за допомогою стандартних біохімічних методів, наприклад, з використанням вектору клонування. Такі сегменти надаються у формі відкритої рамки зчитування, без порушень внутрішніми нетрансльованими послідовностями, чи інтронів, які зазвичай присутні в еукаріотичних генах. Послідовності нетрансльованих ДНК можуть бути 20 присутні за відкритою рамкою зчитування, де вони не заважають маніпуляціям або експресії кодуєчих ділянок.

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

25 Термін "промотор" означає ділянку ДНК, задіяну у зв'язуванні РНК-полімерази для ініціації транскрипції.

Термін "виділений" означає, що матеріал видаляється зі свого первісного середовища (наприклад, природного середовища, якщо він має природне походження). Наприклад, існуючий у природі полінуклеотид чи поліпептид, присутній у живих тваринах, не є виділеним, але той 30 самий полінуклеотид чи поліпептид, відокремлений від якихось чи всіх співіснуючих матеріалів в природній системі, є виділеним. Такі полінуклеотиди можуть бути часткою вектору, та/або такі полінуклеотиди чи поліпептиди можуть становити частину композиції і все ж таки бути виділеними, якщо такий вектор чи композиція не є частиною свого природного середовища.

35 Ці полінуклеотиди та рекомбінантні чи імуногенні поліпептиди, розкриті відповідно до цього винаходу, також можуть бути в "очищений" формі. Термін "очищений" не вимагає абсолютної чистоти; скоріше він має відносне значення та може включати препарати високого ступеня очищення або препарати, які тільки частково очищені, в тому сенсі, як спеціалісти в цій галузі розуміють такі терміни. Наприклад, окремі клони, виділені з бібліотеки кДНК, були стандартним чином очищені до електрофорезної однорідності. Очищення вихідного матеріалу чи природного 40 матеріалу принаймні на порядок величини, переважно на два-три порядки, та більш переважно, на чотири-п'ять порядків величини, чітко передбачається в цьому винаході. Крім того, заявлений поліпептид, котрий має чистоту переважно в 99.999 %, або принаймні в 99.99 чи 99.9 %; і навіть бажано 99 % за масою чи більше, також чітко пропонується у винаході.

45 Нуклеїнові кислоти та поліпептиди як продукти експресії, що розкриваються відповідно до цього винаходу, а також вектори експресії, які вміщують такі нуклеїнові кислоти та/або такі поліпептиди, можуть бути в "збагаченій формі". Термін "збагачений" в тому вигляді, в якому він використовується тут, означає, що концентрація матеріалу принаймні приблизно в 2, 5, 10, 100 або 1000 разів перевищує його природну концентрацію (наприклад), бажано 0,01 %, за масою, принаймні краще приблизно 0,1 % за масою. Також маються на увазі збагачені препарати 50 приблизно в 0,5, 1, 5, 10 та 20 % за масою. Послідовності, конструкції, вектори, клони та інші матеріали, які складають цей винахід, можуть, що більш сприятливо, бути у збагаченій чи виділеній формі.

Термін "активний фрагмент" означає фрагмент, що генерує імунну реакцію (тобто, має імуногенну активність) при введенні індивідуально чи, необов'язково, з прийнятим ад'ювантом, 55 тварині, наприклад, ссавцю, такому як кролик чи миша, і також включаючи людину, до того ж така імунна реакція має вид стимуляції Т-клітинної відповіді у тварини-реципієнта, такої як людина. Альтернативно, "активний фрагмент" також може використовуватись для індукування Т-клітинної відповіді *in vitro*.

60 В цьому винаході терміни "частка", "сегмент" і "фрагмент", якщо вони використовуються відносно поліпептидів, означають безперервну послідовність залишків, таких як амінокислотні



залишки, причому ця послідовність утворює підгрупу більшої послідовності. Наприклад, якщо поліпептид був підданий обробці будь-якою з типових ендопептидаз, таких як трипсин або хімотрипсин, олігопептиди, одержані в результаті такої обробки, будуть представляти частки, сегменти чи фрагменти початкового поліпептиду. Це означає, що будь-який такий фрагмент

5 буде обов'язково містити як частину своєї амінокислотної послідовності сегмент, фрагмент або частину, яка є по суті ідентичною, якщо не повністю ідентичною, послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO:33, котра відповідає природним або "вихідним" білкам послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO:33. Якщо такі терміни використовуються стосовно полінуклеотидів, вони означають продукти, одержані після обробки зазначених полінуклеотидів будь-якою з типових

10 ендонуклеаз.

Відповідно до цього винаходу, термін "відсоткова ідентичність" або "відсоток ідентичності" відносно послідовності означає, що послідовність порівнюється із заявленою або описаною послідовністю після вирівнювання послідовності, яка порівнюється ("Послідовність, що порівнюється"), з описаною або заявленою послідовністю ("Контрольна послідовність").

15 Відсоткова ідентичність визначається відповідно до наведеної нижче формули:

Відсоткова ідентичність =  $100 [1 - (C/R)]$ ,

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

Послідовністю, що порівнюється, де

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

(ii) кожний розрив у Контрольній послідовності та

(iii) кожна вирівняна основа чи амінокислота у Контрольній послідовності, яка відрізняється від вирівняної основи чи амінокислоти у Послідовності, що порівнюється, являє собою різницю, та R це кількість основ чи амінокислот в Контрольній послідовності на довжині вирівнювання з

25 Послідовністю, що порівнюється, з будь-яким розривом, утвореним в Контрольній послідовності, також зарахованим як основа чи амінокислота.

Якщо існує вирівнювання між Послідовністю, що порівнюється, та Контрольною послідовністю, для якої відсоткова ідентичність, що розрахована вище, є приблизно рівною чи

30 більшою, ніж зазначена мінімальна Відсоткова ідентичність, то Послідовність, що порівнюється, має зазначену мінімальну відсоткову ідентичність до Контрольної послідовності, хоча можуть існувати вирівнювання, в яких розрахована, як описано вище, Відсоткова ідентичність є меншою, ніж зазначена Відсоткова ідентичність.

Первісні пептиди, що розкриваються в цьому винаході, можуть модифікуватися заміщенням

35 одного чи кількох залишків на різних, можливо, селективних, ділянках пептидного ланцюгу, якщо не зазначено інакше. Такі заміщення можуть бути консервативного характеру, наприклад, коли одна амінокислота замінюється амінокислотою подібної структури та характеристик, тобто, коли гідрофобна амінокислота замінюється іншою гідрофобною амінокислотою. Навіть більш консервативною буде заміна амінокислот такого ж чи подібного розміру та хімічного характеру,

40 наприклад, коли лейцин замінюється ізолейцином. В дослідженнях варіацій послідовностей в сімействах природних гомологічних білків певні амінокислотні заміщення допускаються частіше, ніж інші, і вони часто демонструють кореляцію зі схожістю за розміром, зарядом, полярністю та гідрофобністю між первісною амінокислотою та її заміною, і це є основою для визначення "консервативних заміщень".

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

50 (Phe, Tyr, Trp).

Менш консервативні заміщення можуть включати заміну однієї амінокислоти іншою, котра має подібні характеристики, але дещо відрізняється за розміром, наприклад, заміна аланіну ізолейциновим залишком. Високо-неконсервативні заміни можуть включати заміщення кислотої амінокислоти полярною, або навіть такою, що є основною за своїм характером. Такі

55 "радикальні" заміщення не можуть, однак, відхилятися як потенційно неефективні, оскільки їх хімічні наслідки не є повністю прогнозованими, та радикальні заміщення також можуть несподівано призвести до сприятливих ефектів, які неможливо передбачити за простими хімічними принципами.

Безумовно, такі заміщення можуть включати структури, що відрізняються від звичайних L-амінокислот. Отже, D-амінокислоти можуть заміщуватися L-амінокислотами, котрі зазвичай

60

виявляються в антигенних пептидах цього винаходу та все ж охоплюються розкриттям в ньому. Крім того, амінокислоти, які мають нестандартні R-групи (тобто R-групи інші, ніж можна знайти в 20 стандартних амінокислотах природних білків) також можуть використовуватись для заміщення, з метою отримання імуногенів та імуногенних поліпептидів, відповідно до цього винаходу.

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

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

Переважно, коли ЦТЛ, специфічні відносно пептиду з послідовністю від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 33 досліджують у порівнянні із заміщеними пептидами, то концентрація пептиду, за якої заміщені пептиди досягають половини максимального росту лізису відносно фонових значень, є не більше ніж 1 мМ, переважно не більше ніж 1 мкМ, ще більш переважно не більше ніж приблизно 1 нМ, і ще більш переважно не більше ніж приблизно 100 пМ, і найбільш переважно не більше ніж приблизно 10 пМ. Переважно також, щоб заміщений пептид розпізнавався ЦТЛ, отриманими від більш ніж однієї особи, принаймні двох, і більш переважно трьох осіб.

Отже, епітопи відповідно цього винаходу можуть бути ідентичними природним пухлино-асоційованим та пухлино-специфічним епітопам або можуть включати епітопи, які відрізняються не більше ніж на 4 залишку від контрольного пептиду, оскільки вони мають по суті ідентичну антигенну активність.

Імунотерапевтичні підходи до лікування

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

Специфічні елементи клітинного імунного відгуку здатні специфічно розпізнавати та знищувати пухлинні клітини. Виділення цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) із популяції пухлино-інфільтруючих клітин або з периферичної крові говорить про те, що такі клітини відіграють важливу роль у природному імунному захисті проти раку. Особливо важливу роль у цій відповіді відіграють, зокрема, CD8-позитивні Т-клітини (TCD8<sup>+</sup>), які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності I класу (МНС). Ці пептиди зазвичай складаються з 8-12 амінокислотних залишків, що отримані з білків або дефектних рибосомних продуктів (DRIP), які містяться у цитозолі. Молекули МНС людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

Молекули МНС I класу можна виявити в більшості клітин, що мають ядра, ці молекули презентують пептиди, які утворюються в результаті розщеплення протеолітичними ферментами переважно ендогенних, цитозольних білків чи білків ядра, продуктів DRIP та великих за розміром пептидів. Однак, пептиди, одержані з ендосомальних компартментів чи екзогенних джерел, також часто зустрічаються на молекулах МНС I класу. Цей неklasичний спосіб презентації молекулами I класу називається у науковій літературі крос-презентацією.

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

можуть мати підвищену експресію і, таким чином, можуть бути опосередковано пухлино-асоційованими. Такі опосередковано пухлино-асоційовані антигени також можуть бути мішенями у вакцинаційному підході. У обох випадках важливим є те, щоби в амінокислотній послідовності антигену були присутні епітопи, оскільки такий пептид ("імуногенний пептид"), отриманий із пухлино-асоційованого антигену, має приводити до відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

По суті, будь-який пептид, що здатний зв'язувати молекулу МНС, може функціонувати як епітоп Т-клітини. Передумовою індукції відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo* є присутність Т-клітин із відповідним Т-клітинним рецептором і відсутність імунологічної толерантності до цього конкретного епітопу.

Таким чином, ТАА є стартовою точкою для розробки протипухлинних вакцин. Методи ідентифікації та визначення характеристик ТАА базуються на використанні ЦТЛ, які можна виділити з організму пацієнтів або здорових суб'єктів, або вони ґрунтуються на генерації різних профілів транскрипції або різному характері експресії пептидів тканинами пухлин і нормальними тканинами (Lemmel і співавт., 450-54; Weinschenk і співавт., 5818-27).

Проте ідентифікація генів, які надмірно експресуються пухлинними тканинами або лініями клітин пухлин людини, або селективно експресуються в таких тканинах або клітинних лініях, не дає точної інформації щодо використання антигенів, що кодуються цими генами, в імунній терапії. Причиною цього є те, що тільки окрема субпопуляція епітопів цих антигенів придатна для такого застосування, оскільки має бути присутня Т-клітина з відповідним ТКР і імунологічна толерантність відносно цього епітопу повинна бути відсутньою або мінімальною. Таким чином, важливо вибрати тільки такі пептиди з надмірно експресованих або селективно експресованих білків, які презентуються зв'язаними з молекулами МНС, проти яких можливо знайти функціонуючу Т-клітину. Така функціонуюча Т-клітина визначається як Т-клітина, яка при стимуляції конкретним антигеном може бути клонована і здатна виконувати функції ефектора ("ефекторна Т-клітина").

Т-хелперні клітини відіграють важливу роль в регуляції ефекторної функції ЦТЛ у протипухлинному імунітеті. Епітопи Т-хелперів, які запускають відповідь цих клітин типу Т<sub>H1</sub> підтримують ефекторні функції CD8-позитивних клітин Т-кілерів, котрі включають цитотоксичні функції, спрямовані проти клітин пухлини, що експресують комплекси пухлино-асоційованого пептиду/МНС на поверхнях своїх клітин. У такий спосіб епітопи пухлино-асоційованих пептидів Т-хелперів самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованих пептидами можуть служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції.

Оскільки обидва типи реакцій, залежні від CD8 та CD4, спільно та синергічно роблять свій внесок у протипухлинну дію, для розробки протипухлинних вакцин важливими є ідентифікація та характеристика пухлино-асоційованих антигенів, які розпізнаються CD8-позитивними ЦТЛ (молекули МНС I класу) чи CD4-позитивними ЦТЛ (молекули МНС II класу). Отже, метою цього винаходу є в розробка композицій пептидів, які вміщують пептиди, що зв'язуються з комплексами МНС будь-якого класу.

Беручи до уваги серйозні побічні ефекти і витрати, пов'язані з лікуванням раку, існує нагальна потреба у кращих методах прогнозування і діагностики. Отже, є потреба в ідентифікації інших чинників, які виконують роль біомаркерів раку взагалі і раку шлунка зокрема. Отже, існує потреба ідентифікувати фактори, які можливо буде використовувати для лікування раку взагалі і раку шлунка зокрема.

До того ж, немає стандарту лікування пацієнтів, хворих на рак шлунка з біохімічним рецидивом після радикальної простатектомії, зазвичай обумовленим залишковою пухлиною *in situ* за наявності росту місцево-поширеної пухлини. Бажано розробити нові терапевтичні підходи, що забезпечать більш низьку захворюваність при аналогічній терапевтичній ефективності відносно існуючих терапевтичних підходів.

Предметом цього винаходу є пептиди для лікування раку шлунка та інших пухлин, які експресують на високому рівні пептиди за винаходом. Ці пептиди, за даними мас-спектрометрії, презентуються природно молекулами HLA на зразках тканин первинного раку шлунка (див. приклад 1 і фігуру 1).

Було показано, що вихідний ген, із якого отримані пептиди, дуже надмірно експресується у випадку раку шлунка, нирково-клітинної карциноми, раку товстої кишки, недрібноклітинного раку легенів, аденокарциноми, раку передміхурової залози, доброякісної пухлини та злоякісної меланоми у порівнянні з нормальними тканинами (див. приклад 2 і фігуру 2), що свідчить про високий ступінь зв'язку пептиду з пухлиною, тобто, ці пептиди у значній мірі презентуються на тканинах пухлини, але не на нормальних тканинах.

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

Було показано, що всі пептиди, які були сумісні з платформою валідації, - див. приклад 3, - цього винаходу, здатні стимулювати відповідь Т-клітин (див. Приклад 3 і Фігуру 3). Отже, пептиди можуть використовуватись для генерації імунної відповіді організму пацієнта, завдяки чому клітини пухлини можуть бути зруйновані. Імунна відповідь організму пацієнта може індукуватися прямим введенням пацієнту описаних пептидів або відповідних прекурсорних речовин (наприклад, подовжених пептидів, білків або нуклеїнових кислот, які кодують ці пептиди), ідеально в комбінації з агентом, що підвищує імунну реакцію (тобто, ад'юванта). Можна очікувати, що імунна відповідь, що виникає в результаті такої терапевтичної вакцинації, є високо специфічною відносно клітин пухлини, оскільки пептиди-мішені за цим винаходом не є присутніми на нормальних тканинах у достатній кількості копій, що попереджає ризик небажаних аутоімунних реакцій проти нормальних клітин в організмі пацієнта.

Фармацевтичні композиції включають пептиди або у вільній формі, або у формі фармацевтично прийнятної солі. Термін "фармацевтично прийнятна сіль" в тому виді, в якому він використовується тут, означає похідну сполуку розкритих пептидів, в якій пептид модифікується шляхом створення кислоти чи основної солі речовини. Наприклад, кислі солі готуються з вільної основи (як правило, де нейтральна форма лікарського засобу має нейтральну -NH<sub>2</sub>-групу), за участю реакції з прийнятною кислотою. Прийнятні кислоти для приготування кислих солей включають органічні кислоти, такі, наприклад, як оцтова кислота, пропіонова кислота, гліколева кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, яблучна кислота, малінова кислота, бурштинова кислота, малеїнова кислота, фумарова кислота, винна кислота, лимонна кислота, бензойна кислота, корична кислота, мигдальна кислота, метансульфо кислота, етансульфо кислота, р-толуолсульфо кислота, саліцилова кислота і т. ін., а також неорганічні кислоти, наприклад, соляна кислота, бромисто-воднева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота і т. ін. І навпаки, приготування основних солей кислотних компонентів, які можуть бути присутніми на пептиді, здійснюється з використанням фармацевтично прийнятної основи, такої як гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид амонію, гідроксид кальцію, триметиламін і тому подібні.

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

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

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

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

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

Ці пептиди можуть використовуватися для продукції і розробки антитіл, специфічних до комплексів МНС/пептид. Вони можуть застосовуватися для лікування, націлюючи токсини або

радіоактивні речовини на хворі тканини. Іншим використанням цих антитіл може бути націлювання радіонуклідів на хворі тканини з метою формування зображень, таких як позитронна емісійна томографія (ПЕТ). Таке використання може виявляти невеликі метастази або визначати розмір і точну локалізацію хворих тканин.

5 Крім того, вони можуть використовуватися для підтвердження патоморфологічного діагнозу: рак на основі дослідження біоптату.

У Таблиці 2 описані пептиди за цим винаходом, їх відповідні SEQ ID NO: і білки, з яких можуть походити ці пептиди. Всі пептиди зв'язуються з алелями HLA A\*024.

Таблиця 2:

## Пептиди за цим винаходом

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	"Вихідний" білок (Вихідні білки)
1	CDC2-001	LYQILQGIVF	CDK1
2	ASPM-002	SYNPLWLRI	ASPM
3	UCHL5-001	NYLPFIMEL	UCHL5
4	MET-006	SYIDVLPEF	MET
5	PROM1-001	SYIIDPLNL	PROM1
6	MMP11-001	VWSDVTPLTF	MMP11
7	MST1R-001	NYLLYVSNF	MST1R
8	NFYB-001	VYTTSYQQ1	NFYB
9	SMC4-001	HYKPTPLYF	SMC4
10	UQCRB-001	YYNAAGFNKL	UQCRB
11	PPAP2C-001	AYLVYTDRL	PPAP2C
12	AVL9-001	FYISPVNKL	AVL9
13	NUF2-001	VYGIRLEHF	NUF2
14	ABL1-001	TYGNLLDYL	ABL1
15	MUC6-001	NYEETFPHI	MUC6
16	ASPM-001	RYLWATVTI	ASPM
17	EPHA2-005	VYFSKSEQL	EPHA2
18	MMP3-001	VFIFKGNQF	MMP3
19	NUF2-002	RFLSGIINF	NUF2

10

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	"Вихідний" білок (Вихідні білки)
20	PLK4-001	QYASRFVQL	PLK4
21	ATAD2-002	KYLTVKDYL	ATAD2
22	COL12A1-001	VYNPTPNL	COL12A1
23	COL6A3-001	SYLQAANAL	COL6A3
24	FANCI-001	FYQPKIQQF	FANCI
25	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
26	ATAD2-001	AYAIKEEL	ATAD2
27	ATAD2-003	LYPEVFEEKF	ATAD2
28	HSP90B1-001	KYNDTFWKEF	HSP90B1
29	S1AH2-001	VFDTAIAHLF	S1AH2
30	SLC6A6-001	VYPNWA1GL	SLC6A6
31	IQGAP3-001	VYKVVGNNLL	IQGAP3
32	ERBB3-001	VYIEKNDKL	ERBB3
33	KIF2C-001	IYNGKLFDDL	KIF2C

## Додаткові перспективні HLA A\*024 пептиди за винаходом

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	"Вихідний" білок (Вихідні білки)
34	CCDC88A-001	QYIDKLNEL	CCDC88A
35	CCNB1-003	MYMTVSIIDRF	CCNB1
36	CCND2-001	RYLPQCSYF	CCND2
37	CCNE2-001	IYAPKLQEF	CCNE2
38	CEA-010	IYPDASLLI	CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6
39	CLCN3-001	VYLLNSTTL	CLCN3
40	DNAJC10-001	IYLEVIHNL	DNAJC 10
41	DNAJC10-002	AYPTVKFYF	
42	E1F2S3-001	IFSKIIVSLF	EIF2S3, LOC255308
43	E1F3L-001	YYYVGFAYL	EIF3L, LOC340947
44	EPPK1-001	RYLEGTSCI	EPPK1
45	ERBB2-001	TYLPTNASLSF	ERBB2
46	GPR39-001	SYATLLHVL	GPR39
47	ITGB4-001	DYTIGFGKF	ITGB4
48	LCN2-001	SYNVTSVLF	LCN2

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	"Вихідний" білок (Вихідні білки)
49	SDHC-001	SYLELVKSL	LOC642502, SDHC
50	PBK-001	SYQKVIELF	PBK
51	POLD3-001	LYLEN1DEF	POLD3
52	PSMD14-001	VYISLALL	PSMD14
53	PTK2-001	RYLPKGFLNQF	PTK2
54	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
55	TSPAN1-002	VYTTMAEHF	TSPAN 1
56	ZNF598-001	DYAYLREHF	ZNF598
57	ADAM 10-001	LYIQTDHLFF	ADAM 10
58	MMP12-001	TYKYVDINTF	MMP12
59	RRM2-001	YFISHVLAF	RRM2
60	TMPRSS4-001	VYTKVSAYL	TMPRSS4
61	TSPAN8-001	VYKETCISF	TSPAN8

5

У іншому втіленні цього винаходу розкриваються як засіб проти раку шлунка пептиди, що зв'язуються з HLA A\*02. Для людей, що є A\*02- та/або A\*24-позитивними, суміші пептидів, розкритих у винаході, можуть застосовуватися для лікування раку шлунка. Переважними є суміші від 2 до 20 пептидів і суміші 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 і 20 пептидів.

10

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	"Вихідний" білок (Вихідні білки)
62	DIO2-001	ALYDSVILL	DIO2
63	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3
64	LMNB1-001	LADETLCLKV	LMNB1
65	WNT5A-001	AMSSKFFLV	WNT5A
66	FAP-003	YVYQNNIYL	FAP
67	COPG-001	VLEDLETV	COPG, COPG2, TSGA13
68	COL6A3-002	FLLDGSANV	COL6A3
69	COL6A3-003	NLLDLDYEL	COL6A3
70	COL6A3-004	FLIDSSEGV	COL6A3
71	PSMC2-001	ALDEGDIAL	PSMC2
72	UBE2S-001	ALNEEAGRLLL	UBE2S
73	KIF11-001	ILSPTVVSI	KIF11
74	ADAM8-001	K.LLTEVHAA	ADAM8

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	"Вихідний" білок (Вихідні білки)
75	CCNB1-001	ALVQDLAKA	CCNB1
76	CDC6-001	ILQDRLNQV	CDC6
77	F2R-001	TLDPRSFL	F2R
78	OLFM4-001	TLDDLLEYI	OLFM4
79	THY 1-001	SLLAQNTSWLL	THY1
80	CEP250-001	SLAEVNTQL	CEP250
81	HIF1A-001	ALDGFVMVL	HIF1A
82	KRAS-001	GVDDAFYTL	KRAS
83	MET-001	YVDPVITSI	MET
84	NCAPG-001	YLLSYIQSI	NCAPG
85	NCAPG-002	QIDDVITIKI	NCAPG
86	TOP-004	YLYGQTTTYL	TOP2A
87	TOP-005	KLDETGNSL	TOP2A
88	LAMC2-002	RLDDLKMTV	LAMC2
89	AHR-001	LTDEILTYV	AHR
90	CCNB 1-002	ILIDWLVQV	CCNB1
91	CEACAM6-001	VLYGPDVPTI	CEACAM6
92	COPB1-001	SIFGEDALANV	COPB1
93	HMMR-001	KLLEYIEEI	HMMR
94	TPX2-001	KILEDVVG	TPX2
95	TOP-001	KIFDEILVNA	TOP2A, TOP2B

#### Білок циклу 2 поділу клітин (CDC2)

Серин/треонін кінза CDC2, відома також під назвою Cdk1 (циклін-залежна кінза 1) відіграє ключову роль у контролі клітинного циклу. Відомо, що вона є головним регулятором переходу G2/M клітинного циклу. У кінці інтерфази вона зв'язується з циклінами А-типу. Після руйнування ядерної оболонки цикліни А-типу заміщуються цикліном В, який утворює разом із Cdc2 фактор, що стимулює мітоз (MPF). Фактор MPF регулює проходження клітин по мітотичному циклу.

Функція кінзи Cdc2 у процесі мітозу не дублюється нічим і не може компенсуватися активністю інших протеїнкіназ, таких як Cdk2, 4 та 6. На протилежність цьому, повідомлялося, що Cdc2 виявляє активність під час інших фаз клітинного циклу, також таких як G1/S перехід, і що вона здатна замінити "Cdk інтерфази". Отже, припускається, що Cdc2 є єдиною ключовою Cdk клітинного циклу.

Надмірна експресія Cdc2 була виявлена в клітинах декількох видів пухлин, причому це часто було зв'язано з несприятливим прогнозом. Серед них карцинома передміхурової залози, карциноми порожнини рота, плоскоклітинного раку порожнини рота (OSCC), гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ) (Qian і співавт.), пов'язаної з *H. pylori* MALT-лімфоми (Banerjee і співавт., 217-25) і карциноми товстої кишки (Yasui і співавт., 36-41). У випадку раку шлунка повідомлялось про надмірну експресію та/або підвищену активність, що може бути причиною виникнення хвороби. Інгібітори Cdc2 та інших Cdk розглядались як "кандидати у лікарський засіб" для терапії раку (Shapiro 1770-83).

Білок веретена поділу, що асоційований із аутосомною рецесивною первинною мікроцефалією (ASPM)

Аномальний ген аутосомної первинної мікроцефалії (ASPM), що кодує білок веретена поділу, є у людини ортологом гена *asr Drosophila*. Він бере участь в регуляції розвитку нервової клітини, і його мутації призводять до аутосомної рецесивної первинної мікроцефалії. Ген ASPM локалізований у полюсах веретена під час мітозу. Підвищену експресію гена ASPM запропонували використовувати як маркер і потенційну терапевтичну мішень при гліобластомі. Опосередкований siRNA "нокдаун" інгібує проліферацію клітин пухлини і нервових стовбурових клітин. Підвищена експресія гена ASPM може також передбачити підвищений інвазивний/метастатичний потенціал, ранній рецидив пухлини і несприятливий прогноз розвитку гепатоцелюлярної карциноми. Ген ASPM показав підвищену експресію в іморталізованих клітинах і тканинах недрібноклітинного раку легенів (Jung, Choi та Kim 703-13).

#### Матричні металопротеїнази 3 (MMP3)

MMP3, яка має також назву прожелатиназа або стромелізин 1, є ендопептидазою, що розщеплює такі компоненти позаклітинного матриксу (ECM) як фібронектин, ламінін, еластин, коров'ячий білок протеогліканів і неспіральні ланцюги колагену. MMP є важливим компонентом

кількох фізіологічних процесів, що потребують перегрупування ЕСМ, таких як міграція клітин під час ембріогенезу, реконструювання тканин, васкуляризація, інволюція молочної залози та загоєння ран. MMP3 також відіграє певну роль у агрегації тромбоцитів. Клінічні прояви патологічного стану, що охоплюють підвищену експресію і секрецію MMP3, включають запальні стани і рак. MMP3 має підвищену експресію в деяких пухлинах і відіграє важливу роль у епітеліально-мезенхімальному переході (ЕМП). Вона також робить внесок у ранні стадії канцерогенезу, запускаючи епігенетичні зміни, які призводять до злоякісного фенотипу (Lochter і співавт., 180-93). Було показано, що поліморфізм и промотора MMP3, що зв'язані з рівнями експресії, впливають на ризики і прогноз для деяких видів раку, таких як аденокарцинома стравоходу (Bradbury і співавт., 793-98) і плоскоклітинний рак порожнини рота (Vairaktaris і співавт., 4095-100) (Liu і співавт., 430-35). У Н. pylori-позитивних пацієнтів, хворих на рак шлунка з підвищеним рівнем MMP3 і MMP7 у сироватці, спостерігались вищі рівні інвазії лімфатичних вузлів і коротше виживання. У когорті із 74 пацієнтів, які мають рак шлунка, MMP3 експресувався у 27 % випадків (Murray і співавт., 791-97).

#### Ген c-Met

Ген c-Met є посередником потенційно онкогенної активності фактора росту гепатоцитів (HGF)/фактора розсіювання, у тому числі сприяння клітинному росту, рухливості клітин, коротшому виживанню, деградації позаклітинного матриксу і ангиогенезу. Зв'язування HGF активує низхідні сигнальні шляхи, включаючи Ras, фосфатиділінозитол 3'-кіназний, фосфоліпазний C $\gamma$  і міоген-активовані протеїнкіназні шляхи (Dong і співавт., 5911-18; Furge і співавт., 10722-27; Furge, Zhang та Vande Woude 5582-89; Montesano і співавт., 355-65; Naldini і співавт., 501-04; Ponzetto і співавт., 4600-08). c-Met експресується переважно у клітинах епітелію. Онкогенна активація c-Met (що також відбувається в неепітеліальних тканинах злоякісних пухлин) може відбуватися в результаті ампліфікації/надмірної експресії, активуючих мутацій, переходу на HGF/c-Met аутокринне зачароване коло або конститутивне фосфорилування. 147-54; Ferracini і співавт., 739-49; Fischer і співавт., 733-39; Kooshekpour і співавт., 5391-98; L і співавт., 8125-35; Maulik і співавт., 41-59; Qian і співавт., 589-96; Ramirez і співавт., 635-44; Tuck і співавт., 225-32) (Nakaigawa і співавт., 3699-705). Конститутивна активація c-Met в організмі трансгенних мишей, у яких спостерігається надмірна експресія HGF, сприяє онкогенезу широкого спектру (Takayama і співавт., 701-06; Wang і співавт., 1023-34). Сайленсинг MET приводить до інгібування росту пухлин і метастазування (Corso і співавт., 684-93). Ампліфікація MET була пов'язана прогресуванням раку шлунка людини (Lin і співавт., 5680-89). (Yokozaki, Yasui і Tahara 49-95).

#### Убіквітин-карбоксил-термінальна гідролаза L5 (UCHL5)

UCHL5, відома також під назвою убіквітин-карбоксил-термінальна гідролаза (UCH37) або INO80R, є протеасомо-асоційованою деубіквітиназою. Вона розбирає зв'язані з білком поліубіквітинові ланцюги, починаючи з дистального кінця шляхом розщеплення ізопептидного зв'язку між C-термінальними Cys76 і Lys48 (Nishio і співавт., 855-60). У ядрі UCHL5 утворює зв'язок із Ino80 хроматин-ремоделюючим комплексом. Після зв'язування протеасоми він активується і може сприяти управлінню процесом транскрипції або репарації ДНК, яка, як припускається, опосередкована Ino80 і протеасомою.

Специфічні до убіквітину протеази, такі як UCHL5, беруть участь у декількох процесах, таких як управління проходженням клітинного циклу, диференціація, реплікація і репарація ДНК, транскрипція, контроль якості білка, імунна відповідь і апоптоз. UCHL5 може сприяти злоякісному переродженню. Його активність, як було показано, підвищується у клітинах карциноми шийки матки у порівнянні з прилеглими нормальними тканинами. Можливо знизити активність убіквітину і таким чином стабілізувати рецептор TGF-бета та його медіатори по низхідній, транскрипційні фактори Smad, таким чином активуючи TGF-бета-сигнальний шлях. Активація сигнального шляху за участю TGF-бета може діяти як промотор пухлини на пізніх стадіях раку, хоча він має подвійну функцію і може також бути супресором пухлинного росту на ранніх стадіях та перед ініціацією (Bierie і Moses 29-40; Horton і співавт., 138-43; Wicks і співавт., 8080-84; Wicks і співавт., 761-63).

#### Макрофаг-стимулюючий білковий рецептор (MST1R)

Рецептор MST1R (інакше RON) є членом сімейства Met присутніх на поверхні клітин рецепторів тирозинових кіназ і головним чином експресується на епітеліальних клітинах і макрофагах. MST1R може індукувати міграцію, інвазію, проліферацію і виживання клітини у відповідь на її ліганд. Були описані його онкогенні властивості *in vitro*, а також у моделях *in vivo* у тварин, і часто спостерігається його дерегуляція у хворих на рак людей (Dussault і Bellon. 2009). Клінічні дослідження показали, що надмірна експресія MST1R пов'язана із несприятливим прогнозом і метастазами. Експресія MST1R є значною у тканинах раку і відповідних



паранеопластичних тканинах, але не спостерігається у нормальній слизовій оболонці шлунка (Zhou і співавт., 236-40). "Нокдаун" MST1R в клітинах раку передміхурової залози приводить до зниження хемотаксису клітин ендотелію *in vitro* і до уповільнення росту пухлини і зниження щільності мікросудин після ортотопічної трансплантації в передміхурову залозу *in vivo*. siPHK-опосередкований нокдаун MST1R у висококанцерогенній лінії клітин раку товстої кишки приводив до зниження проліферації у порівнянні з контрольними клітинами.

Кінезиноподібний білок (KIF2C)

KIF2C це деполімераза мікротрубочок, що регулює належне їх прикріплення до кінетохора під час формування веретена поділу. Це є важливим для сегрегації хромосом в анафазі і може бути необхідним для координації початку розщеплення сестринських хроматид. Порушення прикріплення мікротрубочок до кінетохора призводить до порушення сегрегації хромосом і анеуплоїдії, які спостерігаються в найбільш солідних пухлинах (Maney і співавт., 67-131; Moore і Wordeman 537-46). KIF2C є надмірно експресованим у клітинах раку молочної залози (Shimo і співавт., 62-70), раку товстої кишки, колоректального раку і раку шлунка (Nakamura і співавт., 543-49). Лінія клітин раку шлунка (AZ521), яка стабільно експресує KIF2C, показала підвищену проліферацію і міграцію у порівнянні з клітинами з імітованою трансфекцією. Підвищена експресія KIF2C клітинами раку шлунка може свідчити про інвазію лімфатичних вузлів, метастази в лімфатичні вузли і несприятливий прогноз. Обробка клітин раку молочної залози короткими інтерферуючими РНК проти KIF2C інгібує їхній ріст.

Білки 4 структурної підтримки хромосом (SMC4)

SMC-білки є хромосомними АТФазами, що відіграють певну роль в організації вищих порядків структури хромосом і її динаміці. SMC4 є ключовим компонентом конденсинового комплексу, що бере участь у конденсації хроматину, і він також зв'язаний із сегрегацією хромосом і репарацією ДНК і підтримкою хромати нового скелету. Було показано, що ген SMC4 експресується на високому рівні у нормальній передміхуровій і слинній залозі, дуже слабо у товстій кишці, підшлунковій залозі і тонкій кишці і взагалі не експресується в інших тканинах. Експресія РНК на високому рівні спостерігалася у багатьох лініях клітин раку і зразках ракових тканин, включаючи рак молочної залози, передміхурової залози, товстої кишки і підшлункової залози (Egland і співавт., 5929-34).

Рецептор 2 ефрину А (EPH2)

Ефриніві рецептори - це унікальне сімейство рецепторів тирозинкіназ (RTK), які відіграють головну роль в формуванні органів і систем ембріону, нейронному націлюванні та розвитку судин під час нормального ембріогенезу. Стимуляція EphA2 його лігандом (ефрин-А1) приводить до автофосфорилування EphA2, ця стимуляція змінює напрямок онкогенної трансформації. Ефриніві рецептори та їх ліганди, ефрини, часто експресуються на високому рівні при самих різних видах раку. Рецептор EphA2 часто експресується на високому рівні і функціонально змінюється в клітинах агресивних пухлин. Вважають, що він сприяє росту пухлини шляхом підвищення адгезії клітини до позаклітинного матриксу, без'якірного росту і ангиогенезу. Надмірна експресія EphA2 і EphrinA-і була виявлена у тканинах раку шлунка, що корелювало з глибиною інвазії пухлини, стадіями поширення пухлини (TNM), метастазуванням у лімфатичні вузли і несприятливим прогнозом (Yuan і співавт., 2410-17).

ATAD2

ATAD2 (відомий також як ANCCA) є новим членом сімейства білків, що є АТФазами

AAA+. Він підсилює транскрипційну активність андрогенового рецептора (AR) і естрогенового рецептора (ER), що приводить до транскрипції генів, включаючи IGF1R, IRS-2, SGK1 і виживання (AR) і цикліну D1, c-мус і E2F1 (ER), відповідно. Він також збільшує транскрипційну активність c-Мус.

Експресія ATAD2 є високою у декількох пухлинах людини, таких як рак молочної залози, рак передміхурової залози і остеосаркома. Така експресія пов'язана з несприятливим прогнозом.

AVL9

Несподівано, цей білок був описаний як вихідний білок, і доступні лише неякісні і дуже обмежені дані про білок AVL9 і про функцію відповідного гена.

Колаген альфа-1 (XII) (Col12A1)

Колаген альфа-1 (XII) є білком, амінокислотну послідовність альфа-1 ланцюга якого кодує ген COL12A1. Цей ген кодує альфа-ланцюг колагену типу XII, члена сімейства колагенів FACIT (фібрил-асоційованих колагенів із потрібною колагеновою спіраллю). Колаген типу XII є гомотримером, який, як було виявлено, асоційований із колагеном типу I, причому ця асоціація, як вважається, модифікує взаємодію між фібрилами колагену I і оточуючим матриксом. Були ідентифіковані альтернативні сплайс-варіанти транскрипта, що кодує різні ізоформи.

Колаген альфа-3(VI) (COL6A3)

COL6A3 кодує альфа-3 ланцюг, один із трьох альфа-ланцюгів колагену типу VI. Було показано, що домени білку зв'язують білки позаклітинного матриксу. Ця взаємодія пояснює важливість цього колагену в організації компонентів матриксу. Ремоделювання позаклітинного матриксу шляхом надмірної експресії колагену VI сприяє розвитку резистентності клітин раку яєчника до дії цисплатину. Присутність колагену VI має зв'язок із ступенем злоякісності пухлини, прогностичним фактором для раку яєчника (Sherman -B au st і співавт., 377-86). COL6A3 надмірно експресувався в тканинах колоректальної пухлини (Smith і співавт., 1452-64), карциноми слинної залози (Leivo і співавт., 104-13) і інакше експресувався у хворих на рак шлунка (Yang і співавт., 1033-40). COL6A3 був ідентифікований як один із семи генів із пухлино-специфічними сплайс-варіантами. Підтверджені пухлино-специфічні змінення сплайсингу були послідовними, даючи змогу легко розділити нормальні і ракові зразки і у деяких випадках навіть зразки різних стадій розвитку пухлини (Thorsen і співавт., 1214-24).

Анемія Фанконі, комплементна група I (FANCI)

Білок FANCI локалізується у хроматин у відповідь на ушкодження ДНК і бере участь у репарації ДНК (Smogorzewska і співавт., 289-301). Мутації у гені FANCI є причиною анемії Фанконі, генетично гетерогенного рецесивного захворювання, для якого характерні цитогенетична нестабільність, гіперчутливість до агентів, що зшивають ДНК, висока кількість розривів хромосом і дефектність репарації ДНК. Змінений сплайсинг FANCI приводить до двох шляхів сплайсинга транскрипта, що кодує різні ізоформи.

Білок теплового шоку 90 кДа бета-1 (HSP90B1)

HSP90 (відомий також під назвою білка 94, що регулюється глюкозою, Grp94), член 1, належить до групи білків людини, що забезпечують коректне посттрансляційне згортання білкових молекул. Він бере участь у ER (ендоплазматичний ретикулум)-асоційованих процесах: трансляції, контролю якості білка і ER-асоційованої деградації (ERAD), ER-стрес чутливості та зв'язування / утримання кальцію в ER (Christianson і співавт., 272-82; Fu і Lee 741-44). HSP90 містить послідовність KDEL, типову для білків, що утримують ER, але вона також є присутньою на поверхні пухлинних клітин (Altmeyer і співавт., 340-49), так само як і поза клітиною. HSP (білки теплового шоку), як відомо, вивільняються з некротичних (але не апоптотичних) клітин і клітин, що були піддані різним видам стресу, таким як тепловий і окислювальний шок, і їх можна виявити у кровообігу (Basu і співавт., 1539-46; Tsan і Gao 274-79). Позаклітинно HSP90 модулює (головним чином, стимулює) імунні відповіді і бере участь у презентації антигенів. На поверхні клітин він може відігравати роль рецептора входження патогену та/або сигналювання (Cabanès і співавт., 2827-38). У разі пухлино-специфічної експресії на поверхні клітини або вивільнення з неї він може індукувати протипухлинний імунітет (Zheng і співавт., 6731-35). Було продемонстровано, що вакцини на основі HSP90 імунізують проти раку та інфекційних хвороб у дослідженнях ефективності як при профілактиці, так і при лікуванні (див. огляд Bolhassani і Rafati 1185-99; Castelli і співавт., 227-33; Murshid, Gong, і Calderwood 1019-30)). Проте HSP90 може також розглядатися як мішень для протипухлинної терапії, оскільки 1) його вміст корелює з прогресуванням пухлини і приводить до резистентності відносно апоптозу, а також до опромінення або хіміотерапії і 2) він у великій кількості експресується в багатьох пухлинах, включаючи рак шлунка, остеосаркому (Guo і співавт., 62-67), рак молочної залози (Hodorova і співавт., 31-35). Надмірна експресія HSP90 пов'язана з агресивністю пухлин і несприятливим прогнозом для хворих на рак шлунка (Wang, Wang, і Ying 35-41; Zheng і співавт., 1042-49). Знижений рівень експресії HSP90 у клітинах раку шлунка приводить до апоптозу ракових клітин (Sheu, Liu, і Lan e1096).

MUC6

MUC6 експресується клітинами слизової оболонки. Його головна функція, як вважається, слугувати засобом захисту уразливих епітеліальних поверхонь від руйнівної дії постійного впливу широкого діапазону ендогенних їдких або протеолітичних агентів (Toribara і співавт., 1997). MUC6 може також відігравати роль в епітеліальному органогенезі (Reid і Harris, 1999). Була виявлена експресія MUC6 в нормальній слизовій оболонці шлунка. Він надмірно експресується тканинами деяких видів пухлин, таких як аденома і карцинома товстої і тонкої кишки, карцинома легенів (Hamamoto і співавт., 891-96), колоректальні поліпи (Bartman і співавт., 210-18), рак молочної залози (Pereira і співавт., 210-13), в той час як він не експресується у відповідних нормальних тканинах. Припускається, що висока швидкість експресії MUC6 у ракових пухлинах слизових оболонок діє як бар'єр для розповсюдження пухлини, що приводить до їх менш агресивної біологічної поведінки (Matsukita і співавт., 26-36). Експресія MUC6 була більш низькою у карциномах шлунка, ніж в аденомах або нормальних слизових оболонках, і обернено залежить від розміру пухлини, її глибини і ступеню інвазії, лімфатичної і венозної інвазії, метастазів у лімфатичні вузли і стадії за класифікацією UICC.

Низька експресія MUC6 може сприяти злоякісному переродженню клітин епітелію шлунка і лежати в основі росту, інвазії, метастазування і диференціації карцином шлунка (Zheng і співавт., 817-23). Є також докази того, що інфекція *Helicobacter pylori*, одна з головних причин розвитку карцином шлунка, зв'язана зі зниженою експресією MUC6 (Kang і співавт., 29-35; Wang і Fang 425-31).

#### Білок кінетохора Nuf2

Ген NUF2 (CDCA-1) кодує білок, що є дуже подібним до дріжджового Nuf2, компонента стабільного білкового комплексу, асоційованого з центромерою. Дріжджовий Nuf2 зникає із центромери під час профазы мейозу, коли центромери втрачають свій зв'язок із полюсами веретена. Він відіграє регуляторну роль в сегрегації хромосом. Було показано, що міРНК сурвівіну і hNuf2 здійснюють тимчасовий "нокдаун" їхніх мРНК, спричиняючи багатоядерність і загибель клітин завдяки затримці клітини в мітозі, відповідно (Nguyen і співавт., 394-403). NuO і Heel необхідні для організації стабільних сайтів зв'язування на плюс-кінці мікротрубочок на зовнішній мембрані, які необхідні для стабільних сил у напрямку полюсів для біологічної орієнтації на кінетохорах (DeLuca і співавт., 519-31). Було виявлено, що білок Nuf2 експресується у великій кількості в пухлинах NSCLC, що зв'язано з несприятливим прогнозом (Hayama і співавт., 10339-48), і в тканинах раку шийки матки (Martin і співавт., 333-59). У видалених хірургічно тканинах раку шлунка (дифузного типу, 6, кишкового типу, 4) 2 варіанти NUF2 експресуються на високому рівні. Припускається, що альтернативні сплайс-варіанти, виявлені у цьому дослідженні, потенційно придатні для використання як діагностичні маркери та/або нові мішені для протиракової терапії (Ohnuma і співавт., 57-68).

Було виявлено, що siРНК-опосередкований "нокдаун" інгібує проліферацію та індукцію апоптозу в тканинах NSCLC, раку яєчника, раку шийки матки, раку шлунка, колоректального раку і гліоми (Kaneeko і співавт., 1235-40).

#### Ліпід-фосфат-фосфогідролаза 2 (PPAP2C)

Фосфатази фосфатидної кислоти (PAP) сприяють перетворенню фосфатидної кислоти в діацилгліцерин і беруть участь у синтезі гліцероліпідів сіє полю, а також у активованій рецепторами передачі сигналів, опосередкованій фосфоліпазою D. Повідомлялося про три альтернативні сплайс-варіанти транскрипта, що кодують певні ізоформи. Активність PPAP2C є підвищеною у трансформованих первинних зрілих мезенхімальних стовбурових клітинах (MSC) і тканинах багатьох видів пухлин у людини. Це може бути необхідним для підвищеної проліферації клітин. Підвищена експресія PPAP2C, але не каталітично неактивного мутанта, приводила до передчасного входу у S-фазу, що супроводжувалось передчасним накопиченням цикліну A. "Нокдаун" зменшує проліферацію клітин, відтермінуючи вхід у S-фазу (Flanagan і співав. 249-60).

#### 40S рибосомальний білок S11 є білком (RPS11)

Рибосоми складаються з малих 40S субодиноць і великих 60S субодиноць. Разом ці субодиноць складаються з 4 видів РНК і приблизно 80 різних за структурою білків. Ген RPS11 кодує рибосомальний білок, який є компонентом 40S-субодиноць. RPS11 був одним із шести генів, виявлених під час скринінгу на фекальні маркери на основі РНК для діагностики колоректального раку. Його знайшли тільки у фекальних колоноцитах пацієнтів, хворих на рак (Yajima і співавт., 1029-37).

#### E3 убіквітин-лігаза Seven in absentia, гомолог 2 (S1AH2)

S1AH2 є E3 убіквітинлігазою. Серед її субстратів є бета-катенін, TRAF2 і DCC (загублена алель, що містить ген колоректального раку) (Habelhah і співавт., 5756-65; Ни і Fearon 724-32; Nakayama, Qi, і Ronai 443-51). S1AH2 також веде до руйнування ядерного білка герр86, що приводить до аброгації затримки клітини в мітозі, індукованої підвищеною експресією цього білка (Szczepanowski і співавт., 485-90). S1AH2 виявляє як пухлино-, так і метастазо-стимулюючими властивостями, через принаймні два шляхи (див. огляд Nakayama, Qi, і Ronai 443-51): По-перше, він приводить до убіквітинації і деградації білків шляхом гіпоксичної відповіді, які приводять до підвищеної транскрипційної активності індукованих гіпоксією факторів (H1F) (Nakayama, Qi, і Ronai 443-51) (Calzado і співав. 85-91).

По-друге, він пригнічує Sprouty2, специфічний інгібітор сигнального шляху Ras/ERK.

Для активності S1AH2 спостерігається кореляція з розвитком пухлин підшлункової залози, ймовірно, за рахунок його позитивного впливу на Ras-сигнальний шлях (Nakayama, Qi, і Ronai 443-51).

Хоча роль S1AH2 при раку дещо суперечлива, деякі звіти описують зв'язок низьких рівнів S1AH2 із більш несприятливим прогнозом або терапевтичною відповіддю (Confalonieri і співавт. 2959-68) (Jansen і співавт., 263-71), інші демонструють пухлиногенну функцію (Frasor і співавт., 13153-57). Інгібування S1AH2 вважалось за протиракову терапію, оскільки, як було показано,

воно інгібує ріст ксенотрансплантата у моделі меланоми миші (Qi і співавт., 16713-18; Shah і співавт., 799-808), і ліній клітин раку легенів людини, трансплантованих "голій" миші (Ahmed і співавт., 1606-29).

Натрій- і хлорид-залежний тауриновий транспортер (SLC6A6) SLC6A6 є натрій- і хлорид-залежним тауриновим транспортером (TauT) (Han і співавт., 2006). Миші з "нокаутом" тауринового транспортера (taut<sup>-/-</sup>) можуть страждати хронічною хворобою печінки у зв'язку з дефіцитом таурину, яка може включати мітохондріальну дисфункцію (Warskulat і співавт., 2006). Експресія SLC6A6 є пригніченою геном-супресором пухлинного росту p53 і активується протоонкогенами, такими як WT1, c-Jun, і c-Myc. Надмірна експресія SLC6A6 захищає клітини нирки від цисплатин-обумовленої нефротоксичності (Han і співавт., 2006; Han і Chesney, 2009) Експресія SLC6A6 мРНК підтримувалась на високому рівні фактором некрозу пухлини альфа (ФНП-альфа) у клітинах Caco-2 кишкового епітелію людини (Mochizuki і співавт., 2005).

Убіхінон-зв'язувальний білок комплексу убіхінол-цитохром С оксидоредуктаза (UQCRB) Білок, що кодується геном UQCRB, є частиною комплексу убіхінол-цитохром С оксидоредуктаза. Він зв'язує убіхінон і бере участь у переносі електрона. Мутації в цьому гені пов'язані із дефіцитом мітохондріального комплексу III. Був описаний псевдоген на X хромосомі.

UQCRB-ген може бути потенційним онкогеном або геном-супресором пухлинного росту у разі аденокарциноми протоків підшлункової залози (Harada і співавт., 13-24). Було показано, що він активно експресується в тканинах гепатоцелюлярної карциноми (Jia і співавт., 1133-39)

Рецептор 3 епідермального фактора росту людини (ERBB3)

ERBB3 кодує одного члена сімейства рецепторів епідермального фактора росту з тирозинкіназною активністю (EGFR). Він активується нейрегулінами, іншими ERBB- і не-ERBB-рецепторами, а також іншими кіназами і новими механізмами.

По низхідній він інтенсивно взаємодіє з фосфоінозитол 3-кіназою/білками, що беруть участь в антиапоптозному AKT-залежному/мітогенному сигнальних шляхах, але також із GRB, SHC, SRC, ABL, rasGAP, SYK і регулятором транскрипції EBP1 (Sithanandam і Anderson 413-48).

Надмірна експресія ERBB3 була виявлена у багатьох ракових пухлинах, включаючи рак шлунка, де він може відігравати причинну роль і негативно впливати на прогноз (Kobayashi і співавт., 1294-301) (Slesak і співавт., 2727-32). (Zhang і співавт., 2112-18) виявили, що надмірна експресія ERBB3 була більш характерною для дифузного типу (26,2%) раку шлунка, ніж для кишкового (5,0 %). Для обох типів його надмірна експресія зв'язана з несприятливим прогнозом. Підходи для націлювання на ERBB3 у терапії раку включають РНК-аптамери на позаклітинний домен (Chen і співавт., 9226-31), блокаду експресії генів синтетичними факторами транскрипції (Lund і співавт., 9082-91), використання невеликих молекул інгібіторів, таких як ізомер вітаміну Е γ-токотриєнол (Samant і Sylvester 563-74), міРНК (Scott і співавт., 1479-86) і siРНК (Sithanandam і співавт., 1847-59).

Промінін-1 (Prom1)

Функція: Промінін-1, який також відомий як CD 133, був ідентифікований як молекула, специфічна до гематопоетичних клітин-попередників CD34<sup>+</sup> (Yin і співавт., 1997), і, як було показано, є маркером для нормальних стовбурових клітин і ракових стовбурових клітин (CSC) різних тканин. Він міститься, головним чином, на виступах плазматичних мембран і може брати участь в організації топології мембран або у підтримці ліпідного складу плазматичної мембрани. Було зроблене припущення, що сплайс-ізоформа промініна-1, що має назву AC 133-2 і в якій є відсутнім невеликий екзон із 27 амінокислот, може слугувати навіть кращим маркером стовбурових клітин (Mizrak і співавт., 2008; Bidlingmaier і співавт., 2008).

Тільки невеликий відсоток пухлинних клітин зазвичай є промінін-1-позитивними, як це очікувалося для маркера CSC. Залежно від виду пухлини, кількість позитивних клітин на масу пухлини лежить в діапазоні від 1 до 15 % і найчастіше становить близько 2 %. Спостерігався зв'язок промініна-1 з утворенням пухлини, ангиогенезом і стійкістю до впливу хімічних речовин (Zhu і співавт., 2009a) (Bruno і співавт., 2006; Hilbe і співавт., 2004) (Bertolini і співавт., 2009). Проте промінін-1-позитивні клітини можуть бути доступними для дії імунної системи, оскільки вони можуть бути знищені NK-клітинами (Castriconi і співавт., 2007; Pietra і співавт., 2009) і цитотоксичними Т-клітинами (Brown і співавт., 2009).

Хоча для багатьох видів раку було показано, що промінін-1-позитивні клітини функціонально є CSC і експресія часто пов'язана з несприятливим прогнозом, все ж таки існують деякі протиріччя. Деякі звіти свідчать, що він не є ні необхідним, ні достатнім для ідентифікації CSC (Cheng і співавт., 2009; Wu і Wu, 2009). Можливо, що комбінація промініна-1 з іншими молекулами, такими як CD44, або навіть складні комбінації, такі як prom1(+), CD34(+), CD44(+), CD38(-), CD24(-), можуть служити кращими маркерами CSC. Для дифузного раку шлунка було зроблене припущення щодо експресії PROM 1 на основі результатів аналізу in silico (Kato і

Katoh, 2007), і про високий рівень його експресії у порівнянні з нормальними тканинами шлунка при рівні білка повідомлялось у роботі (Smith і співавт., 2008). Проте (Boegl і Prinz, 2009) повідомляли, що експресія промініна-1 була зниженою в тканинах раку шлунка, особливо на пізніх стадіях, і стверджували, що експресія промініну-1 скоріше корелює з ангіогенезом - який також є зниженим на пізніх стадіях - ніж із ростом пухлини. У дослідженні з використанням ліній клітин раку шлунка (Takaishi і співавт., 2009) стверджується, що не промін-1 є маркером CSC раку шлунка.

#### Матрична металопротеїназа 11 (MMP11)

Як інші MMP, MMP11 є ендопептидазою, що бере участь у процесах, які потребують відновлення тканин, таких як розвиток, загоєння ран і утворення шраму. Він також може негативно регулювати гомеостаз жирів, зменшуючи диференціацію адипоцитів. На відміну від інших MMP, він не здатний розщеплювати типові молекули позаклітинного матриксу, за винятком колагену VI. Проте були ідентифіковані інші субстрати, такі як альфа-2-макроглобулін, певні інгібітори серинпротеаз (серпіни), включаючи альфа-1-антитрипсин, білок-1, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту, і ламініновий рецептор. При раку MMP 11 головним чином експресується у стромальних клітинах, що оточують пухлинну тканину. Це було показано для багатьох видів раку. Як було встановлено, MMP11 надмірно експресується в стромі найбільш інвазивних карцином людини, але рідко у саркомах та інших неепітеліальних пухлинах. У більшості, але не в усіх випадках, MMP11 експресується у клітинах строми, безпосередньо прилеглих до пухлини, тоді як самі пухлинні клітини, нормальні тканини і клітини строми, відділені від пухлини, є негативними. Більш високі рівні MMP 11 пов'язані з злоякісним фенотипом / більшою інвазією пухлин і несприятливим прогнозом. Проте у випадку папілярних карцином щитоподібної залози експресія MMP11 обернено пов'язана з агресивністю. MMP11 був виявлений у тканині пухлини, а також у сироватці пацієнтів, хворих на рак шлунка, і спостерігалась кореляція його експресії з метастазуванням (Yang і співавт.). Окрім того, (Deng і співавт., 274-81) показали, що MMP11 на високому рівні експресується в лініях клітин пухлин і у первинній пухлині хворих на рак шлунка - на відміну від інших видів раку, не виключно у стромі - і що він, можливо, прискорює проліферацію клітин пухлини.

#### Субодинамія Y ядерного фактора транскрипції (NFYB)

NFYB, відома також під назвою CBF-B або CBF-A, є, окрім NFYA і NFYC, частиною гетерогримерного базального фактора транскрипції NF-Y (також відомий як CCAAT-зв'язувальний фактор або CBF), який зв'язується з мотивами CCAAT або з протилежними мотивами, ATTGG, що має назву Y-box - у промоторах і енхансерах багатьох генів. Серед генів-мішеней NF-Y є гени MHC II класу, рецептор PDGF-бета, декілька білків теплового шоку, ген hMLH1 репарації помилково спарених нуклеотидів і топоізомераза II альфа.

NFYB не є класичним онкогеном, проте його активність може сприяти онкогенезу. По-перше, гени клітинного циклу, такі як гени цикліну A, цикліну B1, Aurora A і cdk1, є мішенями NF-Y. Відбувається арешт клітинного циклу під час фази G2/M без дії NFYB. (Park і співавт.) показали, що підвищений рівень цикліну B2 та інших пов'язаних із клітинним циклом генів у колоректальній аденокарциномі спостерігається завдяки активності NF-Y. По-друге, активність NF-Y протидіє апоптозу. Клітини, у яких не вистачає NF-Y, зазнають апоптоз завдяки активації p53 і зниженій транскрипції антиапоптотичних генів, які містять CCAAT-box у своїх промоторах, таких як Bcl-2 (Benatti і співавт., 1415-28). По-третє, його онкогенні властивості підсилюються в комбінації з іншими факторами транскрипції. Наприклад, мутований p53 з'єднується з NF-Y і p300-білками, підвищуючи експресію NF-Y-індукованих генів клітинного циклу.

#### ABL1

Білок тирозинкіназа c-Ab1 курсує між ядерним і цитоплазматичним компартментами. Ядерний c-Ab1 бере участь у інгібуванні росту клітини і апоптозі, в той час як цитоплазматичний c-Ab1 може відігравати роль у динаміці актину, морфогенезі і сигнальних шляхах, індукованих позаклітинними стимулами, такими як фактор росту і ліганди інтегрину. Повідомлялося, що цитоплазматичний c-Ab1 є промотором мітогенезу. Активність c-Ab1-білка гальмується за негативним зворотнім зв'язком його SH3-доменом, і делеція 8H3-домену перетворює ABL1 на онкоген. При захворюванні хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ) цей ген активується завдяки транслокації на ділянці BCR (розрив у двох ділянках) гена на хромосомі 22. Цей злитий білок, що утворився, BCR-ABL переходить у цитозоль і дозволяє клітинам проліферувати без регуляції цитокінами (Zhao і співавт.). Активність c-Ab1 також підвищується за позитивним зворотнім зв'язком у солідних пухлинах, як було показано для карцином молочної залози і NSCLC. Надмірна експресія є недостатньою, і конститутивна активність кіназ потребує фосфорилування білка. У клітинах раку молочної залози фосфорилування c-Ab1 індукується тирозинкіназами плазматичної мембрани, включаючи SFK, членів сімейства EGFR і рецептор

IGF-1. Злиті білки ABL не були виявлені у солідних пухлинах (Lin і Arlinghaus, 2008). Було показано, що ABL експресується в карциномі шлунка і зв'язаних мікросудинах, що дозволяє припустити його можливу участь у ангиогенезі. Слід заважити, що присутній у H.pylori цитотоксин-асоційований ген (CagA) приводить до активації c-Ab1, який в результаті фосфорилує EGFR і, таким чином, блокує ендцитоз EGFR (Bauer, Bartfeld і Meyer 156-69). Декілька інгібіторів тирозинкінази є більш-менш специфічними до Ab1. Іматиніб (глібек) використовується як терапевтичний засіб першої лінії при CML і був також дозволений до застосування у пацієнтів на пізніх стадіях пухлин строми шлунково-кишкового тракту (GIST), і він також має свою мішенню онкоген KIT (Pytel і співавт., 66-76) (Croom і Perry, 2003). Іншими інгібіторами, що застосовуються для лікування раку, є дезатиніб і нілотиніб (Pytel і співавт., 66-76) (Deremer, Ustun, і Natarajan 1956-75).

Polo-подібна кіназа 4 (Plk4)

Члени сімейства Polo-подібних кіназ Plk 1-4) є важливими під час поділу клітин, регулюючи кілька стадій мітозу. Plk4 регулює формування і дуплікацію центриолей (Rodrigues-Martins і співавт., 1046-50). Хоча загальновідомо, що Plk 1 є онкогеном, функція Plk4 у захворюванні на рак є двозначною. Знижений, як і надмірний рівень експресії Plk4 пов'язаний з захворюванням раком у людей, мишей і мух. 43-49). Наприклад, в тканинах колоректального раку була виявлена надмірна експресія Plk4, але у невеликій кількості пацієнтів спостерігалась сильно знижена експресія Plk4 (Macmillan і співавт., 729-40). Це можна пояснити тим, що як надмірна експресія, так і дефіцит Plk4 призводить до формування дефектних центриолей, що є причиною аномальної кількості і структури хромосом, які часто виявляються у пухлинних клітинах і сприяють пошкодженню мітотичного апарату, який призводить до порушення сегрегації хромосом і анеупloidії (Peel і співавт., 834-43). (Kuriyama і співавт., 2014-23). (Korzeniewski і співавт., 6668-75).

Білок 3, який активує ГТФазу, що містить IQ мотив (IQGAP3)

IQGAP3 беруть участь у сигнальних шляхах клітин, а також у формуванні архітектури цитоскелету і неспецифічній адгезії клітин. Вони містять домен зі схожою послідовністю до комплексів RasGAP і, відповідно, зв'язуються з малими ГТФазами. Проте (і незважаючи на їхню назву) жоден з них не має ГТФазу-активуючих властивостей. Для IQGAP1 і IQGAP2 було показано, що вони навіть стабілізують зв'язок Rac1 і Cdc42 із ГТФазою, і було зроблене припущення, що IQGAP3 стабілізує активований Ras (Nojima і співавт., 971-78; White, Brown і Sacks 1817-24). Через свій IQ-домен вони зв'язуються з комплексом кальцій/калмодулін, а через кальпоніноподібний домен - з волокнами актину (White, Brown і Sacks 1817-24). (Wang і співавт., 567-77) повідомляють, що IQGAP3 експресується в мозку, де він зв'язується з волокнами актину, а також із Rac1 і Cdc42. Він накопичується в дистальній частині аксонів і прискорює Rac1/Cdc42-залежний ріст аксонів Білки IQGAP причетні до виникнення раку. Вважається, що IQGAP1 є онкогеном. Він підсилює декілька пов'язаних із раком сигнальних шляхів, таких як MAP-кіназний, бета-катеніновий і VEGF-асоційований шлях передачі сигналу і надмірно експресується у багатьох пухлинах. Вважається, що IQGAP2, навпаки, відіграє роль супресора пухлинного росту, і, як було виявлено, його вміст знижений у хворих на рак шлунка з несприятливим прогнозом (White, Brown і Sacks 1817-24). Щодо IQGAP3 доступна інформація є недостатньою. (Skawran і співавт., 505-16) показали, що він належить до генів, які мають дуже високий ступінь експресії в тканинах гепатоцелюлярної карциноми. У двох дослідженнях відзначалося, що IQGAP3 є специфічно експресованим у клітинах, що проліферують (KI67+) у тонкій та товстій кишці і печінці мишей (Nojima і співавт., 971-78) (Kunimoto і співавт., 621-31).

Двоспиральний домен, що містить 88a (CCDC88A)

CCDC88A є актин-зв'язувальним субстратом Akt, який задіяний в організації актину, Akt-залежній рухливості клітин у фібробластах. CCDC88A/Akt сигнальний шлях також є важливим у VEGF-опосередкованому постнеонатальному ангиогенезі.

CCDC88A на високому рівні експресується у багатьох тканинах злоякісних пухлин у людини, включаючи карциноми молочної залози, товстої кишки, легенів і шийки матки.

Він відіграє важливу роль у прогресуванні з абераційною активацією Akt-сигнального шляху.

Циклін B1 (CCNB1)

CCNB1 індукується під час G2/M фази мітозу і утворює фактор, стимулюючий мітоз (MPF) разом із циклін-залежною кіназою 1 (Cdk1)/Cdc2. Надмірна експресія була виявлена у багатьох видах ракових пухлин і часто пов'язана з несприятливим прогнозом перебігу, наприклад, раку молочної залози (Aaltonen і співавт., 2009; Agarwal і співавт., 2009; Suzuki і співавт., 2007), медулобластоми (de і співавт., 2008), NSCLC (Cooper і співавт., 2009), раку шийки матки (Zhao і співавт., 2006) та інших. Він був одним із генів, що входять у генетичний підпис, який складається із 11 генів і, як було виявлено, передбачає короткий термін до рецидиву хвороби у

пацієнтів із 12 різними видами раку (Glinsky, 2006). Ніякої інформації щодо власне раку шлунка знайдено не було.

#### Циклін D2 (CCND2)

CCND2 зв'язує і активує, як інші цикліни D-типу (D1 і D3), циклін-залежну кіназу 4 (Cdk4) або Cdk6. Це є необхідним для переходу від G1- до S-фази. Було виявлено, що CCND2 надмірно експресується у багатьох пухлинах, включаючи пухлини яєчка і яєчника (Sicinski і співавт., 1996), злоякісні гематологічні хвороби (Hoglund і співавт., 1996; Gesk і співавт., 2006) і рак шлунка, де це може бути спричинено інфекцією *H.pylori*, і пов'язано з несприятливим прогнозом (Yu і співавт., 2003). (Yu і співавт., 2001) (Oshimo і співавт., 2003) (Takano і співавт., 1999) (Takano і співавт., 2000).

#### Циклін E2 (CCNE2)

CCNE2 зв'язує і активує, подібно до іншого E-подібного цикліну CCNE1, Cdk2. Активність має пікове значення при переході від G1 до S-фази. В умовах здорового організму CCNE2 не виявляється в клітинах у стані спокою і може бути виявлений лише у тканинах, клітини яких активно діляться (Payton і Coats, 2002). Він часто аберантно експресується у ракових пухлинах, наприклад, раку молочної залози, що корелювало в несприятливим прогнозом (Desmedt і співавт., 2006; Ghayad і співавт., 2009; Payton і співавт., 2002; Sieuwerts і співавт., 2006), і метастатичному раку передміхурової залози (Wu і співавт., 2009).

Пов'язані з раковомембранним антигеном молекули клітинної адгезії 1, 5 і 6 (CEACAM 1,5 і 6)

CEACAM є мембрано-заякореними глікопротеїнами, які опосередковують міжклітинні взаємодії і активують сигнальні шляхи інтегринів (Chan і Stanners, 2007). Вони також можуть відігравати роль рецепторів для патогенів, таких як *E.coli* (Berger і співавт., 2004) (Hauck і співавт., 2006) і брати участь в імунній регуляції (Shao і співавт., 2006). CEACAM5 і CEACAM6 мають проканцерогенні властивості. Вони інгібують апоптоз (Ordonez і співавт., 2000), сприяють утворенню метастазів (Marshall, 2003; Ordonez і співавт., 2000) і порушують поляризацію клітинних мембран і архітектуру тканини (Chan і Stanners, 2007). Роль CEACAM1 у захворюванні на рак є двозначною. Він може бути супресором пухлини на ранніх стадіях і сприяти формуванню метастазів, уникненню імунної відповіді і ангиогенезу на пізніх стадіях (Hokari і співавт., 2007; Liu і співавт., 2007; Moh і Shen, 2009). Його функціональна роль залежить від ізоформи, оскільки CEACAM1 зустрічається в 11 сплайс-варіантах, співвідношення між якими визначається результатом сигналювання (Gray-Owen і Blumberg, 2006; Leung і співавт., 2006; Neumaier і співавт., 1993; Nittka і співавт., 2008). Співвідношення сплайс-варіантів може змінюватися при захворюванні на рак (Gaur і співавт., 2008).

CEACAM5 або CEACAM6 або вони обидва надмірно експресуються у багатьох випадках, аж до 70% усіх пухлин людини, що часто пов'язано з несприятливим прогнозом (Chan і Stanners, 2007; Chevinsky, 1991). CEACAM5 сироватки є стандартним клінічним маркером карциноми товстої і прямої кишки, причому високі рівні пов'язані з несприятливим прогнозом або рецидивом (Chevinsky, 1991; Goldstein і Mitchell, 2005). Його також запропоновано використовувати як маркер інших видів раку, включаючи рак шлунка, але з обмеженою прогностичною цінністю (Victorzon і співавт., 1995). CEACAM1 може експресуватися на високому або низькому рівні при захворюванні на рак, залежно від виду пухлини (Kinugasa і співавт., 1998) (Dango і співавт., 2008) (Simeone і співавт., 2007). (Han і співавт., 2008) виявили дуже високі рівні CEACAM5 і CEACAM6 у дев'яти лініях клітин раку шлунка, в той час як CEACAM1 не був виявлений. На протилежність цьому, аналіз зразків первинної пухлини від 222 пацієнтів показав або цитоплазматичне, або мембранне забарвлення для CEACAM1. Мембранозв'язана форма мала відношення до підвищеного ангиогенезу (Zhou і співавт., 2009). Дослідження (Kinugasa і співавт., 1998) також продемонструвало високий рівень експресії в аденокарциномах шлунка. У деяких пухлинах CEACAM1 у клітинах експресувався на низькому рівні, що приводило до надмірної експресії VEGF, а VEGF або гіпоксія можуть індукувати CEACAM1 у прилеглому ендотелії. Відповідно, моноклональне антитіло проти CEACAM1 блокувало VEGF-індуковане формування капілярноподібних структур ендотелію (Oliveira-Ferrer і співавт., 2004; Tilki і співавт., 2006; Ergun і співавт., 2000).

Серед інших сполук головним чином як мішень для протиракових препаратів з використанням вакцинаційних підходів вивчався CEACAM5. Ці дослідження показали, що CEACAM5 може бути мішенню клітинних імунних реакцій (Cloosen і співавт., 2007; Marshall, 2003). Огляд епітопів CEACAM5 для Т-клітин наведений у роботі (Sarobe і співавт., 2004).

#### Хлоридний канал 3 (CLCN3)

CLCN3 є Cl<sup>-</sup>-каналом, що може бути механозалежним і сприяє регуляторному зменшенню об'єму (RVD), що відбувається як реакція на зростання об'єму клітини в ході клітинного циклу

або в умовах гіпоосмосу (Lemonnier і співавт., 2004; Sardini і співавт., 2003). Проте з приводу цієї проблеми є суперечлива дискусія (Wang і співавт., 2004), і канал, що зменшує об'єм і який активується під час апоптозу, є відмінним від CLCN3 (Okada Wang і співавт., 2006)

Експресія CLCN3 змінюється під час клітинного циклу, і пік її спостерігається у S-фазі (Wang і співавт.). Струми CLCN3 можуть бути важливими у процесах, що пов'язані з захворюванням на рак, для видів пухлин, в яких рівень експресії CLCN3 високий, таких як гліома. Пухлинні клітини потребують засобів корекції підвищення об'єму за рахунок проліферації і гіпоосмотичних впливів, наприклад, в результаті перитуморального набряку (Ernest і співавт., 2005; Olsen і співавт., 2003; Sontheimer, 2008).

Окрім того, повідомлялося, що CLCN3 підсилює резистентність до етопозиду, підвищуючи підкислення компартмента пізніх ендосом (Weylandt і співавт., 2007).

siPHK-опосередкований "нокдаун" CLCN3 знижував міграцію клітин назофарингеальної карциноми *in vitro* (Mao і співавт., 2008).

#### DNAJC10

DNAJC10 є компонентом надмолекулярного комплексу ER-асоційованої деградації (ERAD), який розпізнає і розкриває білки, що нездатні формувати нативну структуру, що є необхідним для ефективної реалізації ретроградного шляху їхньої ядерної транслокації (Ushioda і співавт., 2008). Було продемонстровано, що рівень цього білка є підвищеним у гепатоцелюлярній карциномі (Sunnea і співавт., 2007). Нокдаун DNAJC10, опосередкований siPHK, у клітинах нейроектодермальної пухлини підсилював апоптотичну відповідь на дію хіміотерапевтичного препарату фенретинід (Corazzari і співавт., 2007). Було показано, що ERdj5 знижує виживаність клітин нейробластоми шляхом зниження відповіді білків, що нездатні формувати нативну структуру (UPR) (Thomas і Spyrou, 2009).

Фактор 2 ініціації трансляції у еукаріот, гамма-субодиниця 3 (EIF2S3) EIF2S3 є найбільшою субодиницею білкового комплексу (EIF2), що залучає метионіл-тРНК до рибосомної 40S-субодиниці (Clemens, 1997). Дія кіназ, що знижують активність EIF, таких як РНК-залежна протеїнкіназа (PKR), може мати проапоптотичний характер і пригнічувати ріст пухлин (Mounir і співавт., 2009). Повідомлялось, що у пухлинах раку шлунка спостерігаються більш високі рівні фосфорильованого і нефосфорильованого EIF2 і перерозподіл у ядро. Ці порушення регуляції вказують на причетність eIF2-альфа до захворювання на рак шлунково-кишкового тракту (Lobo і співавт., 2000).

Фактор 3 ініціації трансляції у еукаріот, субодиниця L (EIF3L)

EIF3L є одною з 10-13 субодиниць EIF3, які зв'язують малу субодиницю рибосоми. EIF3 відіграє важливу роль у ранньому зв'язуванні великої субодиниці рибосоми. EIF3L належить до групи з п'яти субодиниць, про які повідомлялось, що вони не є суттєвими для формування EIF3 (Masutani і співавт., 2007). Скринінг із бібліотеками антисенсових послідовностей наводить на думку, що низький рівень експресії EIF3L посилює антионкогенну активність 5-фторурацилу відносно клітин гепатоцелюлярної карциноми (Doh, 2008).

#### Епіплакін 1 (EPPK1)

EPPK1 є геном сімейства плакінів зі значною мірою невідомими функціями. Відомо, що гени сімейства плакінів задіяні у процесах зв'язування волокон цитоскелету і їхнього закріплення на зоні злипання плазматичних мембран (Yoshida і співавт., 2008).

#### G-білок-асоційований рецептор 39 (GPR39)

GPR39 є рецептором, зв'язаним із Gq-білком, який, як вважається, задіяний у роботі шлунково-кишкового тракту і в процесах метаболізму (Yamamoto і співавт., 2009). Його сигнальний шлях активує цАМФ і фактори транскрипції (Hoist і співавт., 2004). Ендогенним лігандом для GPR39, ймовірно, є цинк (Chen і Zhao, 2007). GPR39 є новим інгібітором клітинної смерті, який може являти собою терапевтичну мішень у контексті процесів, що включають апоптоз і стрес ендоплазматичного ретикулуму, такий як рак (Dittmer і співавт., 2008). Було виявлено, що GPR39 експресується на високому рівні в мікроматрицях на основі як ліній клітин нирок ембріонів людини HFK, так і ксенотрансплантатів пухлини Вільямса зі збагаченням клітинної популяції клітинами пухлин, які за характеристиками схожі на стовбурові (Metsuyanin і співавт., 2009), і в лінії клітин гіпокампусу, стійкій до дії різних стимуляторів клітинної смерті (Dittmer і співавт., 2008).

#### ERBB2/HER2/NEU

ERBB2 є членом сімейства рецепторів тирозинкінази EGFR. Його точний ліганд невідомий, але він є кращим партнером по гетеродимеризації для інших рецепторів сімейства HER (Olayioye, 2001). У карциномах HER2 діє як онкоген, головним чином, оскільки високий рівень ампліфікації гена індукує надмірну експресію білка у клітинній мембрані і подальше набуття злоякісною клітиною властивих їй ознак (Slamon і співавт., 1989). Надмірний рівень експресії



спостерігається у певної частини багатьох видів раку, включаючи рак шлунка. Здебільшого це пов'язано з несприятливим прогнозом (Song і співавт., 2010), (Yonemura і співавт., 1991), (Uchino і співавт., 1993), (Mizutani і співавт., 1993).

ERBB2 є мішенню моноклональних антитіл трастузумаб (що продається під назвою герцептин), який запропоновано як препарат вибору для пацієнтів із HER2-позитивним раком шлунка на пізніх стадіях в комбінації з хіміотерапією (Meza-Junco і співавт., 2009; Van Cutsem і співавт., 2009). Інші моноклональні антитіла, пертузумаб, який інгібує димеризацію рецепторів HER2 і HER3, проходить останні фази клінічних іспитів (Kristjansdottir і Dizon, 2010). Вибіркова надмірна експресія HER2 і HER3 в пухлинах двох гістологічних типів раку шлунка (кишкового типу і дифузного типу) чітко пов'язана з несприятливим прогнозом (Zhang і співавт., 2009).

#### Інтегрин бета-4 (ITGB4)

Інтегрини опосередковують міжклітинну адгезію, а також двонаправлену передачу регуляторних сигналів з клітини в клітину. Субодиниця інтегрин бета-4 гетеродимеризується з альфа-6-субодиницею. Інтегрин, що сформувався, прискорює утворення гемідесмосом між внутрішньоклітинним кератиновим цитоскелетом і базальною мембраною (Giancotti, 2007). Інтегрин бета-4 виконує подвійну функцію при ракових захворюваннях, оскільки він може бути посередником у процесі стабільної адгезії, з одного боку, і проінвазивному сигналюванні (включаючи Ras/Erk і PI3K сигнальні шляхи) і ангиогенезі, з іншого боку (Giancotti, 2007; Raymond і співавт., 2007). Він надмірно експресується у багатьох пухлинах, а також у клітинах ендотелію з ангиогенним потенціалом, що часто корелює з прогресуванням пухлини і утворенням метастазів. Високі рівні спостерігались у тканинах раку шлунка, особливо в клітинах пухлини з ознаками інвазії в строму (Giancotti, 2007; Tap і співавт., 1996). Проте в недиференційованій карциномі шлунка спостерігались низькі рівні його експресії тоді, коли інвазія пухлини ставала глибшою, завдяки поступовому епітеліально-мезенхімальному переходу, оскільки інтегрин бета-4 є епітеліальним інтегрином (Yanchenko і співавт., 2009).

#### Ліпокалін (LCN2)

LCN2, або нейтрофільний желатиназа-асоційований ліпокалін (NGAL) є білком, що транспортує залізо, який існує у формі мономеру, гомодимеру або гетеродимеру, де він є зшитим дисульфідним зв'язком із MMP9 (Coles і співавт., 1999; Kjeldsen і співавт., 1993). Експресія підвищується у декількох видів пухлин, в деяких випадках це пов'язано з прогресуванням. З точки зору механізмів, він може стабілізувати MMP9 і змінити Е-кадгерин-опосередковану міжклітинну адгезію, у такий спосіб це підвищує інвазію пухлин. Комплекси MMP-9 і LCN2 були пов'язані з гіршою виживаністю хворих на рак шлунка (Kubben і співавт., 2007) (Hu і співавт., 2009). Хоча спостерігався чіткий ефект сприяння розвитку пухлини для різних пухлин людини, у деяких дослідженнях було показано, що LCN2 може інгібувати регуляторний фактор HIF-1-альфа, який сприяє розвитку новоутворень, інгібувати ЖК-кіназний шлях фосфорилування, а також синтез VEGF, у такий спосіб підтверджуючи, що в альтернативних умовах LCN2 також, як це не парадоксально, але має протипухлинну і протиметастатичну дію у новоутвореннях, наприклад, товстої кишки, яєчника і підшлункової залози. (Bolognani і співавт., 2009; Tong і співавт., 2008). LCN2 доцільно використовувати для інгібування ангиогенезу в пухлинах, на додаток до пригнічення метастазування пухлин при таких видах раку, що демонструють gas-активацію (Venkatesha і співавт., 2006).

#### Сукцинатдегідрогеназний комплекс, субодиниця C (SDHC)

SDHC є однією з чотирьох субодиниць сукцинатдегідрогенази, що кодується ядерною ДНК (мітохондріальний комплекс II), яка переносить електрони від сукцинату до убіхінону з утворенням фумарату і убіхінолу. Нестача сукцинатдегідрогенази може призвести до GIST (McWhinney і співавт., 2007). Спадкові пухлини страми шлунково-кишкового тракту можуть виникати в результаті мутацій у генах SDHB, SDHC, і SDHD, що кодують субодиниці сукцинатдегідрогенази, а абдомінальні парагангліоми, пов'язані з шлунково-кишковими пухлинами, можуть виникати тільки в результаті мутацій у SDHC (Pasini і співавт., 2008). Білковий продукт мутантного SDHC у трансгенних мишей викликає окислювальний стрес і може сприяти ушкодженню ДНК, мутагенезу і, зрештою, онкогенезу (Ishii і співавт., 2005). Вважають, що сукцинатдегідрогеназа є супресором пухлин (Baysal, 2003; Gottlieb і Tomlinson, 2005). Зменшені рівні комплексу цього ферменту можуть призводити до онкогенезу (Eng і співавт., 2003).

#### Кіназа із PDZ-зв'язувальним мотивом (PBK)

PBK є членом зв'язаної із MEK3/6 MAPKK, яка активує p38 MAP кіназу, наприклад, після рецепторів факторів росту (Abe і співавт., 2000; Ayllon і O'connor, 2007). PBK може бути вторинною мішенню (Oh і співавт., 2007). Оскільки у дорослих PBK експресується в яєчках (див. нижче), було висловлено припущення, що він бере участь у сперматогенезі (Abe і співавт., 2000;

Zhao і співавт., 2001). Окрім того, він сприяє проліферації і резистентності до апоптозу в пухлинних клітинах. Він фосфорилується і активується під час мітозу, що необхідно для формування веретена поділу і цитокінезу (Gaudet і співавт., 2000; Matsumoto і співавт., 2004; Park і співавт., 2009) (Abe і співавт., 2007). Інші його властивості щодо стимулювання росту і

5 антиапоптотичні властивості включають пригнічення експресії p53 і фосфорилування гістонів (Park і співавт., 2006; Zyкова і співавт., 2006) (Nandi і співавт., 2007). RBK був класифікований як раково-тестикулярний антиген (Abe і співавт., 2000; Park і співавт., 2006), і, як було виявлено, він надмірно експресується при багатьох видах раку.

ДНК-полімераза, дельта-3, додаткова субодиниця (POLD3)

10 Комплекс ДНК-полімерази дельта бере участь у реплікації і репарації ДНК. Він складається із ядерного антигену клітин, що проліферують (PCNA), фактора реплікації C, що складається з декількох одиниць, і полімеразного комплексу із 4 субодиниць: POLD1, POLD2, POLD3 і POLD4 (Liu і Warbrick, 2006). POLD3 відіграє ключову роль у ефективній реактивації PCNA під час циклів дисоціації-асоціації POL-дельта під час стадії елонгації реплікації ДНК (Masuda і співавт.,

15 2007).

26S протеасома (Prosome, macropain), неАТФазна субодиниця, 14 (PSMD14)

PSMD14 є компонентом 26S протеасоми. Вона належить до комплексу 19S (19S структура cap; PA700), який забезпечує, деубіквітинування субстрату під час протеасомної деградації (Spataro і співавт., 1997). Надмірний рівень експресії PSMD14 в клітинах ссавців впливає на

20 проліферацію клітин і на відповідь на дію цитотоксичних препаратів, таких як вінбластин, цисплатин і доксорубіцин (Spataro і співавт., 2002). Пригнічування PSMD14 у клітинах HeLa під час дії siРНК приводило до зменшення життєздатності клітин і до підвищення рівня поліубіквітинованого білка (Gallery і співавт., 2007). Інгібування експресії PSMD14 при дії siРНК суттєво впливає на життєздатність клітин, призводячи до затримки клітин у G0-G1-фазі, що

25 зрештою веде до старіння (Burne і співавт., 2010).

26S протеасома (Prosome, macropain), АТФазна субодиниця, 2 (PSMC2) PSMC2 є частиною 26S-протеасомної системи. Вона є членом сімейства triple-A АТФаз, який виявляє шапероноподібну активність. Було продемонстровано, що ця субодиниця взаємодіє з кількома базальними факторами транскрипції, так що, на додаток до участі у протеосомному шляху, ця

30 субодиниця може бути задіяною у регуляції транскрипції. Було показано, що 26S-протеасомна система в скелетних м'язах може активуватися за рахунок TNF-альфа (Tan і співавт. 2006). У трансгенних мишей, яким впроваджено ген HBx і які є носіями регуляторного гена HBx гепатиту В у своїй зародковій лінії, і у яких розвивається гепатоцелюлярна карцинома, PSMC2 та інші протеасомні субодиниці експресуються на високому рівні у тканинах пухлин (Cui і співавт.,

35 2006). Рівні мРНК для АТФазної субодиниці PSMC2 комплексу 19S збільшувалися при раковій кахексії (Combaret і співавт., 1999).

Білок тирозинкіназа 2 (PTK2)

PTK2 є безрецепторною тирозинкіназою, яка модулює інтегриновий сигнальний шлях і може прискорювати ріст пухлини, її прогресування і утворення метастазів (Giaginis і співавт., 2009); (Hauck і співавт., 2002); (Zhao і Guan, 2009)). Було зроблено припущення, що PTK2 є маркером канцерогенезу і прогресування раку (Su і співавт., 2002; Theocharis і співавт., 2009; Jan і співавт., 2009). Її надмірна експресія та/або підвищена активність спостерігається у дуже багатьох ракових пухлинах людини, включаючи рак шлунка. PTK2 також передає сигнали по

45 низхідній від гастринового рецептора, що сприяє проліферації клітин раку шлунка (Li і співавт., 2008b). Було показано, що 8% карцином шлунка є носіями вірусу Епштейна-Барра (EBV). Для інфікованих EBV субліній клітин раку шлунка людини є характерним підвищене фосфорилування за участю PTK2 (Kassis і співавт., 2002). Рівень фосфорилування тирозина за участю PTK2 у клітинах епітелію шлунка знижується за рахунок дії *cadA*-позитивного продукту *Helicobacter pylori*.

Тетраспанін 1 (TSPAN1) і тетраспанін 8 (TSPAN8)

TSPAN1 і TSPAN8 належать до сімейства тетраспанінів, для яких характерні чотири трансмембранні домени і внутрішньоклітинний N- і C-кінець і які приймають участь в різних процесах, включаючи клітинну адгезію, рухливість клітин, активацію і інвазію пухлини. Вони часто утворюють великі молекулярні комплекси з іншими білками, такими як інтегрини, на

55 поверхні клітини (Tarrant і співавт., 2003; Serru і співавт., 2000). Функції TSPAN1 поки що невідомі і можуть включати участь у секреції (Scholz і співавт., 2009). TSPAN1 надмірно експресується в деяких видах пухлин, часто у кореляції зі стадією, прогресуванням і гіршими результатами для пацієнта. Слід заважити, що повідомлялося про те, що він був надмірно експресований у 56,98% із 86 хворих на рак шлунка, і спостерігалася позитивна кореляція зі

60 стадією хвороби, інфільтрацією і станом лімфовузлів і негативна кореляція з виживаністю і

ступенем диференціації пухлини (Chen і співавт., 2008). Повідомлялося, що TSPAN8 є геном, що був пов'язаним із метастазами у багатьох видів пухлин (PM1D: 16467180). Для рака шлунка і кишечника експресія TSPAN8 пов'язана з несприятливим прогнозом (PMID: 16849554).

Пальцеподібний білок 598, що містить цинк (ZNF598)

5 ZNF598 є пальцеподібним білком, що містить цинк, із поки що невідомими функціями.

Дезінтегрин і металопротеїназа 10 (ADAM-10)

ADAM-10 приймає участь в ангиогенезі, розвитку пухлини і онтогенезі. Він експресується на високому рівні в карциномі шлунка. Селективні інгібітори ADAM-10 проходять зараз клінічні дослідження як препарати для лікування раку. (PMID: 19408347)

10 Матрична металопротеїназа 12 (MMP12)

MMP12 є цинк-залежною ендopeптидазою, що розкладає еластин і багато інших матричних і нематричних білків і яка задіяна у міграції макрофагів і інгібуванні ангиогенезу (Chakraborti і співавт., 2003; Chandler і співавт., 1996; Sang, 1998). Вона також відіграє роль у патологічних процесах руйнування тканин, таких як астма, емфізема і хронічна обструктивна хвороба легенів (ХОХЛ), ревматоїдний артрит і ріст пухлин (Cataldo і співавт., 2003; Wallace і співавт., 2008). Обговорювалася доцільність використання інгібіторів MMP12 як препаратів для лікування цих захворювань (Churg і співавт., 2007; Norman, 2009). Часто спостерігається надмірна експресія MMP12 при захворюванні на рак, де її функції є неоднозначними. Хоча вона може мати відношення до розчинення позаклітинного матриксу і, у такий спосіб, до утворення метастазів, вона може також інгібувати ріст пухлин шляхом продукування ангиостатину, який негативно впливає на ангиогенез. Повідомлялося про підвищену експресію MMP12 у хворих на рак шлунка, і було показано, що це має сприятливий вплив. Було показано, що вона негативно корелює зі щільністю мікросудин, VEGF, ступенем диференціації пухлини, судинною інвазією, метастазами у лімфатичні вузли і ймовірністю рецидиву. Пацієнти з надмірною експресією MMP12 показували суттєво кращу виживаність (Cheng і співавт., 2010; Zhang і співавт., 2007b; Zhang і співавт., 2007a).

Рибонуклеотидредуктаза M2 (RRM2)

RRM2 є однією із субодиниць рибонуклеотидредуктази, яка продукує дезоксирибонуклеотиди із рибонуклеотидів. Надмірна експресія RRM2 спостерігалася в пухлинах, включаючи рак шлунка, вона підвищує метастатичний потенціал (PMID: 18941749) (PMID: 19250552) siPHK-опосередкований "нокдаун" RRM2 уповільнює ріст пухлин в організмах різних біологічних видів (миша, пацюк, мавпа) (PMID: 17929316; PMID: 17404105).

Трансмембранна протеаза, серин 4 (TMPRSS4)

35 TMPRSS4 є трансмембранною серин-протеазою типу II, яка знайдена на поверхні клітин, що мають високий рівень експресії у тканинах декількох видів пухлин, включаючи рак підшлункової залози, товстої кишки і шлунка. Біологічні функції TMPRSS4 при раку поки що невідомі. TMPRSS4 має чотири сплайс-варіанти (Scott і співавт., 2001; Sawasaki і співавт., 2004). Експресія у карциномі яєчника корелювала зі стадією (Sawasaki і співавт., 2004). TMPRSS4 є значно підвищеним у тканинах раку легенів, і siPHK-опосередкований "нокдаун" TMPRSS4 при лікуванні малими інтерферуючими РНК в лініях клітин раку легенів і товстої кишки був пов'язаний зі зменшенням інвазії клітин і адгезії клітин на матриксі, а також із модуляцією проліферації клітин (Jung і співавт., 2008).

Дейодиназа, йодтиронін, тип II (DIO2)

45 DIO2 перетворює прогормон тироксин (T4) у біологічно активний 3,3',5'-трийодтиронін (T3). Він експресується на високому рівні у щитоподібній залозі, і було виявлено, що його експресія та/або активність розрегульована при раку щитоподібної залози (de Souza Meyer і співавт., 2005) (Arnaldi і співавт., 2005). Проте його було також виявлено в інших тканинах, таких як нормальні тканини легенів і тканини раку легенів (Wawrzynska і співавт., 2003), і в пухлинах мозку (Murakami і співавт., 2000).

50 Білок 3 (IGF2BP3), що зв'язує мРНК гена інсуліноподібного фактора росту 2 (IGF2BP3) головним чином міститься у ядрі, де він зв'язує мРНК гена IGF2 і пригнічує її трансляцію. Він відіграє роль в ембріогенезі, і його експресія є низькою у тканинах дорослих. У пухлинних клітинах може спостерігатися високий рівень його експресії, і, таким чином, його вважають онкофетальним білком (Liao і співавт., 2005). Було виявлено, що при багатьох видах раку, включаючи рак шлунка, він надмірно експресується, що пов'язано з несприятливим прогнозом (Jeng і співавт., 2009) (Jiang і співавт., 2006). Пептиди, що були отримані із IGF2BP3, перевірялися в дослідженнях протиракової вакцинації (Копо і співавт., 2009).

Ламін В1 (LMNB1)

60 Ламін В1 є білком ядерної ламіни і він бере участь в забезпеченні стабільності клітинного ядра, в хроматинових структурах і в експресії генів. На ранніх стадіях апоптозу ламін

розкладається (Neamati і співавт., 1995) (Sato і співавт., 2008b; (Sato і співавт., 2008a; (Sato і співавт., 2009). LMNB1 до деякої міри експресується в майже усіх нормальних соматичних клітинах, і раніше проведені дослідження показали, що його вміст може зменшуватися під час патологічних процесів при деяких видах раку, включаючи рак шлунка (Moss і співавт., 1999).

5 Було показано, що при інших видах раку, таких як гепатоцелюлярна карцинома, LMNB1 експресується на високому рівні і його вміст позитивно корелює зі стадією розвитку пухлини, розміром і кількістю вражених лімфовузлів (Lim і співавт., 2002).

Сімейство сигнальних білків типу Wingless вірусів MMTV, що мають інтеграційний модуль, член 5A

10 WNT5A є сигнальним білком, що секритується, задіяним у процесах розвитку і в онкогенезі. Канонічне сигналювання за участю WNT5A через рецептори Frizzled і LRP5/LRP6 приводить до підтримки стовбурових клітин/попередників, в той час як неканонічне сигналювання за участю WNT5A через рецептори Frizzled і ROR2/PTK/Ryk контролює полярність тканин, їх адгезію або рух, наприклад, на межі поділу пухлина/строма, що призводить до інвазії пухлин (Kato і Kato, 2007). Він може відігравати роль супресора у деяких ракових пухлинах, але експресується на високому рівні в інших пухлинах, включаючи рак шлунка, де він сприяє прогресуванню і утворенню метастазів і призводить до несприятливого прогнозу (Li і співавт., 2010) (Yamamoto і співавт., 2009) (Kurayoshi і співавт., 2006).

Білок активації фібробластів, альфа (FAP)

20 FAP є інтегральною мембранною желатиназою. Її передбачувана серин-протеазна активність може відігравати роль у контролі росту фібробластів або епітеліально-мезенхімальних взаємодіях під час розвитку і відновлення тканин і епітеліального канцерогенезу (Scanlan і співавт., 1994). FAP може відігравати певну роль у рості ракової пухлини, розвитку метастазів і ангиогенезі за рахунок процесів адгезії і міграції клітин, а також швидкої деградації компонентів ECM. Він є присутнім на пухлинних клітинах, які проникають до ECM, у реактивних раково-асоційованих фібробластах і клітинах ендотелію, що беруть участь в ангиогенезі, але не в неактивних клітинах того ж типу. (Dolzign і співавт., 2005; Kennedy і співавт., 2009; Rettig і співавт., 1993; Rettig і співавт., 1994; Scanlan і співавт., 1994; Zhang і співавт., 2010). Біла виявлена експресія FAP у клітинах раку шлунка і асоційованих фібробластах строми (Zhi і співавт., 2010) (Chen і співавт., 2006) (Mori і співавт., 2004; Okada і співавт., 2003). В моделі миші було показано, що клітини, які експресують FAP, є обов'язковим імуносупресивним компонентом мікросередовища, що оточує пухлину (Krahan і співавт., 2010). У дослідженнях протипухлинної вакцинації на моделі миші FAP успішно використовувався як мішень для CD8+ і CD4+ Т-клітинної відповіді (Loeffler і співавт., 2006; Wen і співавт., 2010) (Lee і співавт., 2005) (Fassnacht і співавт., 2005).

Комплекс білка Coatamer, субодиниця гамма (COPG);  
комплекс білка Coatamer, субодиниця гамма 2 (COPG2);  
комплекс білка Coatamer, субодиниця бета 1 (COPB1)

40 COPG, COPG2 і COPB1 є субодиницями комплексу білка coatamer, який також має назву цитозольного білкового комплексу 1 (COP1), який пов'язаний із везикулами, що не покриті клатрином. Везикули, що покриті COP1, є посередниками ретроградного транспорту із апарату Гольджі назад до ER і транспорту всередині апарату Гольджі (Watson і співавт., 2004). Вони можуть також бути задіяними в антероградному транспорті (Nickel і співавт., 1998). Ретроградний транспорт регулює, серед інших, залежний від EGF (епідермального фактора росту) ядерний транспорт EGFR (рецептора епідермального фактора росту), який зв'язується з COPG (Wang і співавт., 2010). Було показано, що COPG надмірно експресується в клітинах раку легень і тканинах ендотелію мікросудин ракової пухлини легень (Park і співавт., 2008).

Послідовність повсюдно експресованого COPG2 на 80 % ідентична послідовності GOPG (Blagitzko і співавт., 1999). COPG2 може утворювати COP I-подібний комплекс замість GOPG, який, ймовірно, є функціонально надмірним (Futatsumori і співавт., 2000). Нокдаун COPB1 у клітинній лінії, яка експресує ген трансмембранного регулятора муковісцидозу (CFTR), дав змогу припустити, що комплекс білка Coatamer бере участь у транспорті CRTR у плазматичну мембрану (Denning і співавт., 1992), (Bannykh і співавт., 2000).

Фермент, що кон'югує з убіквітином E2S (UBE2S)

55 UBE2S є допоміжним фактором комплексу, що стимулює анафазу (APC), E3-убіквітинлігазою, яка регулює вихід клітин зі стадії мітотичного поділу і фази G1 за рахунок націлювання на регулятори клітинного циклу. UBE2S подовжує убіквітинові ланцюги після того, як субстрати були попередньо піддані убіквітинуванню іншими компонентами (Wu і співавт., 2010). UBE2S є також націленим на білок VHL для протеасомної деградації, у такий спосіб стабілізуючи HIF-1 -альфа (Lim і співавт., 2008) і, можливо, підтримуючи проліферацію,

епітеліально-мезенхімальний перехід і утворення метастазів (Chen і співавт., 2009) (Jung і співавт., 2006). UBE2S є надмірно експресованим у декількох видах пухлин.

Член сімейства кінезинів 11 (KIF11)

KIF11 є необхідним для формування біполярного мітотичного веретена. Було виявлено, що він надмірно експресується у декількох видах ракових пухлин, часто спостерігається кореляція із параметрами клінічної патології (Liu і співавт., 2010), (Peuge і співавт., 2010). Невеликі молекули інгібіторів KIF11, такі як 8-третил- $\gamma$ -цистеїн (STLC), які були розроблені як потенціальні препарати проти раку, затримують клітини в мітозі і сприяють апоптозу ракових клітин (Tsui і співавт., 2009), (Wiltshire і співавт., 2010), (Ding і співавт., 2010). В клінічних дослідженнях було показано, що інгібітори KIF11 виявляють лише помірну активність (Каап і співавт., 2010; Tunquist і співавт., 2010; Wiltshire і співавт., 2010; Zhang і Хи, 2008).

Білок із дезінтегриновим і металопротеїназним доменом 8 (ADAM8)

Спочатку вважали, що ADAM8 є імуноспецифічним білком ADAM, але його виявили також в клітинах інших типів, часто за умов, які були пов'язані з запаленням і реконструкцією ECM, включаючи ракові пухлини і респіраторні захворювання, такі як астма (Koller і співавт., 2009). Багато видів білків ADAM, включаючи ADAM8, експресуються у злویкісних пухлинах людини, де вони беруть участь у регулюванні активності фактора росту і функцій інтегрину, що призводить до стимулювання росту і інвазії пухлин, хоча точні механізми цих процесів поки що невідомі (Mochizuki і Okada 2007). У пухлинах шлунка миші рівень ADAM8 та інших білків ADAM є підвищеним, ймовірно, завдяки активації передачі сигналу від рецептора EGFR (Oshima і співавт., 2011).

Гомолог білка 6 циклу поділу клітин (*S.cerevisiae*) (CDC6)

CDC6 є важливим для ініціювання реплікації ДНК. Він локалізований у ядрі під час G1, але переходить у цитоплазму на початку фази S. CDC6 також регулює активацію реплікації в точці зв'язування шляхом взаємодії з ATR (Yoshida і співавт., 2010). Порушення регуляції CDC6 може призвести до інактивації локусу INK4/ARF, який кодує три важливих гена-супресора пухлин: p16INK4a і p15INK4b, обидва є активаторами ретинобластомного шляху, і ARF, активатора p53 (Gonzalez і співавт., 2006). siPHK-опосередкований "нолдаун" CDC6 може перешкоджати проліферації і сприяти апоптозу (Lau і співавт., 2006). CDC6 є надмірно експресованим у ракових пухлинах, включаючи рак шлунка (Nakamura і співавт., 2007) (Tsukamoto і співавт., 2008).

Рецептор фактора коагуляції II F2R (тромбіну) (F2R)

F2R, який також має назву рецептору, що активується протеїназами (PAR1), є G-протеїн-зв'язаним рецептором. Сигнали PAR1, PAR2 і PAR4 можуть регулювати вивільнення кальцію або активацію міоген-активованої протеїнкінази і приводити до агрегації тромбоцитів, релаксації судин, проліферації клітин, вивільнення цитокінів і запалення (Oikonomou і співавт., 2010). Вважається, що F2R бере участь у проліферації епітеліальних і пухлинних клітин і в ангіогенезі і є надмірно експресованим у інвазивних і метастатичних пухлинах багатьох видів. Рівні експресії позитивно корелюють із ступенем інвазивності ракової пухлини (Garcia-Lopez і співавт., 2010) (Lurje і співавт., 2010). У клітинах карциноми шлунка активація F2R може запустити каскад реакцій, які прискорюють ріст і інвазію пухлинних клітин, наприклад, надмірну експресію NF- $\kappa$ B, EGFR і тенасцин-С (TN-C) (Fujimoto і співавт., 2010). Відповідно, було виявлено, що експресія F2R у хворих на рак шлунка пов'язана з глибиною інвазії в стінки, перитонеальним поширенням і несприятливим прогнозом (Fujimoto і співавт., 2008). Були описані моноклональні мишині антитіла до PAR1 людини (ATAP-2), які розпізнають епітоп (SFLLRNPN) на N-кінці тромбінового рецептору, а також агоніст рецептору пептиду TFLLRNPNDK (Hollenberg і Compton 2002; Magi і співавт., 1996; Хи і співавт., 1995)

Олфактомедин 4 (OLFM4)

OLFM4, чия функція значною мірою невідома, має високі рівні експресії при запаленні епітелію товстої кишки і при декількох видах пухлин у людини, особливо пухлин системи травлення (Koshida і співавт., 2007). OLFM4 є стійким маркером стовбурових клітин у кишечнику людини і він "мітить" субпопуляцію клітин колоректального раку (van der Flier і співавт., 2009). OLFM4 інгібує білок GRIM-19, що відповідає за апоптоз Zhang і співавт., 2004), (Huang і співавт., 2010), регулює клітинний цикл і прискорює перехід від S-фази під час проліферації ракових клітин. Крім того, OLFM4 пов'язаний з адгезією ракових клітин і метастазуванням (Yu і співавт., 2011b). Примусова надмірна експресія OLFM4 у клітинах пухлини передміхурової залози у мишей призводило до прискореного утворення пухлини у тварин із сингенним трансплантатом (Zhang і співавт., 2004). Було показано, що OLFM4 надмірно експресується при раку шлунка (Aung і співавт., 2006). Інгібування експресії OLFM4 може викликати апоптоз у присутності цитотоксичних агентів у клітинах ракової пухлини шлунка (Kit і співавт., 2010). Була також

виявлена підвищена концентрація OLFM4 у сироватці пацієнтів перед операцією з приводу раку шлунка у порівнянні зі здоровими донорами (Oue і співавт., 2009). OLFM4 був ідентифікований як новий ген-мішень для ретиноевих кислот (RA) і агент для деметилування, як і 5-аза-2'-дезокситидин. Ці два агенти, як виявилось, є ефективними при лікуванні деяких пацієнтів із мієлоїдною лейкемією (Liu і співавт., 2010).

Набір Thy-1 cell surface antigen (THY1)

Thy-1 (CD90) є GPJ-заякореним глікопротеїном, який був виявлений на багатьох видах клітин, включаючи Т-клітини, нейрони, клітини ендотелію і фібробласти. Thy-1 бере участь у декількох процесах, таких як адгезія, відновлення нервової тканини, ріст пухлин, пригнічення росту пухлини, міграція, клітинна смерть і активація Т-клітин. (Rege і Hagood 2006b; Rege і Hagood 2006a) (Jurisic і співавт., 2010). Thy-1 є, очевидно, маркером для ангіогенезу у дорослих, але не у ембріонів (Lee і співавт., 1998). Окрім того, його вважають маркером різних видів стовбурових клітин (мезенхімальних стовбурових клітин, стовбурових клітин печінки ("овальних клітин") (Masson і співавт., 2006), кератиноцитів (Nakamura і співавт., 2006) і гематопоетичних стовбурових клітин (Yamazaki і співавт., 2009). Thy-1 експресується на високому рівні у декількох видах ракових пухлин, включаючи рак шлунка і GIST, для яких його пропонували використовувати як маркер (Yang і Chung 2008; Zhang і співавт., 2010) (Oikonomou і співавт., 2007).

Центросомальний білок 250 кДа (CER250)

Cer250 приймає участь у когезії центрів організації мікротрубочок (Mayor і співавт., 2000) Він також має назву центросомного Nek2-асоційованого білка, або C-Nap1, оскільки він локалізується сумісно із серин/треонінкіназою Nek2 і є її субстратом. Nek2-кіназа і її субстрати регулюють зв'язок між центросомами (Bahmanyar і співавт., 2008). На початку мітозу, коли центросоми розділяються, щоб утворити біполярне веретено, C-Nap1 фосфорилується і потім дисоціює від центросом. Досліди *in vitro* показали, що надмірна експресія Cer250 пошкоджувала організацію мікротрубочок на центросомі (Mayor і співавт., 2002).

Фактор 1, що індукується гіпоксією, альфа-субодиниця (фактор транскрипції із основним доменом типу спіраль-петля-спіраль) (HIF1A)

HIF1A є чутливою до кисню субодиницею фактора, що індукується гіпоксією (HIF), фактора транскрипції, що є активним в умовах гіпоксії, яка часто спостерігається в пухлинах. Він опосередковує транскрипцію більш ніж 60 генів, задіяних у виживанні, метаболізмі глюкози, інвазії, метастазуванні і ангіогенезі (наприклад, VEGF). HIF1 має високий рівень експресії при багатьох видах раку, часто пов'язаних із несприятливим прогнозом, і вважається цікавою мішенню для фармакологічних маніпуляцій (Griffiths і співавт., 2005; Quintero і співавт., 2004; Stoeltzing і співавт., 2004) (Zhong і співавт., 1999). При раку шлунка HIF1A сприяє ангіогенезу (Nam і співавт., 2011), його вміст корелює із розміром пухлини, більш низьким рівнем диференціації, більш пізньою стадією розвитку пухлини, коротшим виживанням (Qiu et al. 2011) і частішими метастазами (Wang і співавт., 2010) (Han і співавт., 2006; Kit і співавт., 2009; Oh і співавт., 2008; Ru і співавт., 2007). Також вважається, що він веде до резистентності до хіміотерапевтичних препаратів, таких як 5-FU, за рахунок інгібування апоптозу, що викликаний ліками, і знижує внутрішньоклітинне накопичення препаратів (Nakamura і співавт., 2009) (Liu і співавт., 2008). Інгібітор HIF-1-альфа 2-метоксиестрадіол значно знижує метастатичні властивості клітин раку шлунка (Rohwer і співавт., 2009).

Гомолог онкогену V-Ki-ras2 саркоми пацюків Кірстена (KRAS)

KRAS є членом суперсімейства малих ГТФаз і протоонкогеном, що бере участь у ранніх стадіях багатьох шляхів передачі сигналів, таких як MAPK- і AKT-опосередковані шляхи, які є потенційно онкогенними. Одиночні амінокислотні заміни ведуть до активації мутацій, приводячи до трансформації білків, які відіграють ключову роль у різних злоякісних пухлинах, включаючи рак шлунка (Capella і співавт., 1991) Онкогенні мутації KRAS рідко спостерігаються при раку шлунка. В одному різновиді раку шлунка локус KRAS був ампліфікованим, що приводило до надмірної експресії білка KRAS. Отже, ймовірно, що ампліфікація гена створює молекулярну основу для надмірної активації KRAS при раку шлунка (Mita і співавт., 2009). Мутантні алелі KRAS сприяють індукції VEGF, спричиненій гіпоксією (Kikuchi і співавт., 2009; Zeng і співавт., 2010). Мutowаний KRAS можливо також виявити у сироватці або плазмі пацієнтів, хворих на рак, і тому було запропоновано використовувати його як легко доступний пухлинний маркер (Sorenson, 2000). Пептид KRAS-001 отриманий тільки з одного із двох сплайс-варіантів – NP\_004976 (188 амінокислот) і не з сплайс-варіанту – NP\_203524 (189 амінокислот). Сплайс-варіанти відрізняються останнім ексоном, в якому міститься KRAS-001.

Не-SMC субодиниця G комплексу конденсина I (NAPG)

NCAPG є частиною комплексу конденсина I, який складається із білків сімейства "structural maintenance of chromosomes" (SMC) і не-SMC білків. Він регулює конденсацію і сегregaцію хромосом під час мітозу (Seipold і співавт., 2009). Надмірна експресія NCAPG була виявлена у багатьох пухлинах, включаючи назофарингеальну карциному (Li і співавт., 2010), гепатоцелюлярну карциному (Satow і співавт., 2010) і меланому (Ryu і співавт., 2007). Серед нормальних тканин NCAPG виявив найвищу експресію в яєчках. Було зроблено припущення, що він є можливим маркером проліферації і потенціальним прогностичним індикатором раку (Jager і співавт., 2000).

ДНК-топоізомераза II альфа (TOP2A) і ДНК-топоізомераза II бета (TOP2B) TOP2A і TOP2B кодуєть високотомологічні ізоформи ДНК-топоізомери, яка регулює і змінює топологічні стани ДНК під час транскрипції і бере участь у конденсації хромосом, розділенні хроматид, реплікації і транскрипції. Топоізомераза є мішенню для декількох протиракових препаратів, таких як антрацикліни, і різноманітні мутації були пов'язані з резистентністю до ліків (Kellner і співавт., 2002) (Jarvinen і Liu, 2006). TOP2A (не TOP2B) є дуже важливим для проліферації клітин. Він розташований поблизу онкогена HER2 і надмірно експресується у переважній більшості HER-2-позитивних пухлинах молочної залози, але також у пухлинах без HER2-позитивного статусу (Jarvinen і Liu, 2003) і в багатьох інших видах пухлин. Для одного різновиду раку шлунка також було виявлено, що TOP2A є ампліфікованим і надмірно експресованим, часто одночасно з HER2 (Varis і співавт., 2002) (Liang і співавт., 2008).

#### Ламінін, гамма 2 (LAMC2)

Ламініни є головними неколагенними компонентами базальних мембран. Вони задіяні в адгезії, міграції, диференціації, сигнальних шляхах і метастазуванні. Гамма 2 ланцюг разом із альфа 3 і бета 3 ланцюгами складають ламінін 5. LAMC2 сприяє у людини інвазії ракових клітин *in vivo*. Він на високому рівні експресується пухлинами у людини на лінії інвазії, і рівень експресії корелює з несприятливим прогнозом (Tsubota і співавт., 2010). Отриманий завдяки дії MMP-2 продукт розщеплення ламініну 5 може активізувати передачу сигналу від рецептора EGFR і сприяти рухливості клітин (Schenk і співавт., 2003). У клітинах карциноми шлунка LAMC2 може індукуватися членами сімейства EGFR або Wnt5a, а інвазивна активність, як було показано, залежить від LAMC2 (Tsubota і співавт., 2010) (Yamamoto і співавт., 2009).

#### Арил-вуглеводневий рецептор (AHR)

AHR зв'язує планарні ароматичні вуглеводні, такі як ТХДД (2,3,7,8-тетрахлордібензо-я-діоксин), і опосередковує транскрипцію генів, включаючи ферменти, що метаболізують ксенобіотики, такі як ферменти цитохром Р450. Він також відіграє роль у проходженні клітинного циклу (Barhoover і співавт., 2010). Вважають, що AhR частково пов'язаний із властивістю діоксину сприяти розвитку пухлини, оскільки йому притаманні проліферативні і антиапоптотичні властивості і він може призвести до порушення регуляції міжклітинного контакту, диференціації і підвищеної рухливості клітин (Watabe і співавт., 2010) (Dietrich і Kaina 2010) (Marlowe і співавт., 2008). Експресія AHR може бути знижена TGF-бета-фактором (Dohr і Abel 1997; Wolff і співавт., 2001) і індукована Wnt- або бета-катеніновим сигнальним шляхом (Cheshire і співавт., 2004). Надмірна експресія AHR була виявлена при багатьох видах раку, включаючи рак шлунка, де він корелює з частою експресією CYP1A1 (Ma і співавт., 2006). Експресія AHR і ядерна транслокація були вище в раковій пухлині шлунка, ніж у нормальних тканинах, і експресія поступово зростала під час канцерогенезу (Peng і співавт., 2009a). Сигнальний каскад AhR підвищує інвазивний потенціал клітин раку шлунка, ймовірно, шляхом с-Jun-залежної індукції MMP-9 (Peng і співавт., 2009b). В моделі миші експресія конститутивно активного мутанта арил-вуглеводневого рецептора (CA-AhR) призводить до розвитку пухлин у шлунку, що корелює з підвищеною смертністю (Andersson і співавт., 2002; Kuznetsov і співавт., 2005). Функція AhR при раку, здається, є неоднозначною, оскільки у декількох дослідженнях була виявлена його здатність пригнічувати розвиток пухлин (Gluschnaider і співавт., 2010) (Fan і співавт., 2010).

Рецептор гіалуронан-опосередкованої рухливості (RHAMM) (HMMR) HMMR можна виявити на поверхні клітин, де він зв'язує гіалуронову кислоту (HA) і взаємодіє з HA-рецептором CD44. Ця взаємодія відіграє роль у таких процесах, як рухливість клітин, загоєння ран і інвазія пухлин (Gares і Pilarski, 2000). Внутрішньоклітинно HMMR асоціюється із цитоскелетом, мікротрубочками, центросомами і мітотичним веретеном і бере участь у контролі цілісності мітотичного веретена. HMMR є надмірно експресованим у тканинах декількох видів пухлин (Sohr і Engeland, 2008). Було зроблено припущення, що HA захищає ракові клітини від імунної атаки. Рівень HA у сироватці часто є підвищеним у пацієнтів із метастазами (Delpech і співавт., 1997). HMMR був визнаний як перспективний пухлино-асоційований антиген і потенціальний прогностичний індикатор при AML і хронічному лімфолейкозі. Пептиди, що були отримані із HMMR, використовувалися як вакцини проти лейкемії. HMMR-001 також перевірялися на

імуногенність *in vitro*, але не використовувалися для вакцинації (Tzankov і співавт., 2011), (Greiner і співавт., 2010; Schmitt і співавт., 2008; Tabarkiewicz і Giannopoulos, 2010), (Greiner і співавт., 2005). Надмірну експресію HMMR було також виявлено при декількох інших видах раку, часто це було пов'язано з несприятливим прогнозом. HMMR також надмірно експресувався при раку шлунка, часто в комбінації з CD44, і було зроблено припущення, що він прискорює інвазію і метастазування (Li і співавт., 1999) (Li і співавт., 2000a) (Li і співавт., 2000b).

TPX2, зв'язаний із мікротрубочками, гомолог (*Xenopus laevis*) (TPX2)

TPRX2 є зв'язаним із проліферацією білком, який експресується в S-, G(2)- і M-фазах клітинного циклу і який вважають маркером проліферації (Cordes і співавт., 2010).

Він є необхідним для нормальної нуклеації мікротрубочок, наприклад, для формування мітотичного веретена. TPX2 з'єднується з Aurora A і активує її (Bird і Human, 2008; Moss і співавт., 2009) Фосфорилування TPX2 за допомогою Polo-подібної кінази 1 підвищує його здатність активувати Aurora A (Eckerdт і співавт., 2009). TPX2 є надмірно експресованим у тканинах багатьох видів пухлин і часто надмірно експресується в комбінації з Aurora-A (Asteriti і співавт., 2010). Прикладами, коли була виявлена надмірна експресія TPX2 (часто пов'язана з несприятливим прогнозом або пізніми стадіями), є менингіома (Stuart і співавт., 2010), рак легенів (Kadara і співавт., 2009), (Lin і співавт., 2006; Ma і співавт., 2006), (Manda і співавт., 1999) і гепатоцелюлярна карцинома (Shigeishi і співавт., 2009b), (Satow і співавт., 2010), (Wang і співавт., 2003).

Отже, цей винахід стосується пептиду, що включає послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95 або їхній варіант, який принаймні на 80 % є гомологічним послідовностям від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95 або їхнього варіанту, що викликає перехресну реакцію Т-клітин із зазначеним пептидом, де зазначений пептид не є повнорозмірним поліпептидом.

Цей винахід також стосується пептиду, що включає послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95 або їхній варіант, який принаймні на 80 % є гомологічним послідовностям від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95, де зазначений пептид або його варіант має загальну довжину між 8 і 100, переважно між 8 і 30 і найбільш переважно між 8 і 14 амінокислот.

Цей винахід також стосується вищезгаданих пептидів, які здатні зв'язуватись з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) класу-I або I людини.

Цей винахід також стосується вищезгаданих пептидів, де пептид складається або по суті складається з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95.

Цей винахід також стосується вищезгаданих пептидів, де пептид є модифікованим та/або включає непептидні зв'язки.

Цей винахід також стосується вищезгаданих пептидів, де пептид є злитим білком, зокрема, таким, що містить N-термінальні амінокислоти HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii).

Цей винахід також стосується нуклеїнової кислоти, що кодує вищезгадані пептиди за умови, що пептид не є повністю людським білком.

Цей винахід також стосується вищезгаданої нуклеїнової кислоти, яка являє собою ДНК, кДНК, ПНК, СНК, РНК чи їхню комбінацію.

Цей винахід також стосується вектору експресії, що здатний експресувати вищезгадану нуклеїнову кислоту.

Цей винахід також стосується пептиду, як зазначено вище, нуклеїнової кислоти, як зазначено вище, або вектору експресії, як зазначено вище, для застосування в медицині.

Цей винахід також стосується клітини-хазяїна, як зазначено вище, що містить нуклеїнову кислоту, як зазначено вище, або вектор експресії, як зазначено вище.

Цей винахід також стосується вищезгаданої клітини-хазяїна, яка є антигенпрезентуючою клітиною.

Цей винахід також стосується вищезгаданої клітини-хазяїна, де антигенпрезентуюча клітина є дендритною клітиною.

Цей винахід також стосується способу отримання згаданого пептиду, причому спосіб включає культивування згаданої клітини-хазяїна і виділення пептиду з клітини-хазяїна або її культурального середовища.

Цей винахід також стосується способу отримання активованих цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) *in vitro*, причому спосіб включає контактування *in vitro* ЦТЛ із навантаженими антигеном молекулами МНС людини I або II класу, що експресуються на поверхні відповідної антигенпрезентуючої клітини протягом періоду часу, достатнього для активації згаданого ЦТЛ



шляхом набуття ним специфічності до антигену, де згаданий антиген є будь-яким із згаданих пептидів.

Цей винахід також стосується способу, як тут описано, де антиген навантажують на молекули МНС I або II класу, що експресуються на поверхні відповідної антигенпрезентуючої клітини шляхом контакту достатньої кількості антигену з антигенпрезентуючою клітиною.

Цей винахід також стосується способу як тут описано, де антигенпрезентуюча клітина містить вектор експресії, здатний експресувати згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 33 або згаданий варіант амінокислотної послідовності.

Цей винахід також стосується активованих цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ), отриманих згідно способу, згаданому вище, які селективно розпізнають клітину, яка абераантно експресує поліпептид, що містить згадану амінокислотну послідовність.

Цей винахід також стосується способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого абераантно експресують поліпептид, що містить будь-яку згадану амінокислотну послідовність, причому спосіб включає, введення в організм пацієнта ефективної кількості цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) згідно визначеному вище.

Цей винахід також стосується застосування будь-якого пептиду, що описаний тут, нуклеїнової кислоти, що описана вище, вектору експресії, що описаний тут, клітини, що описана тут, або активованого цитотоксичного Т-лімфоцита, що описаний тут, як лікарського засобу або в процесі виробництва лікарського засобу.

Цей винахід також стосується застосування, як тут описано, де лікарський засіб являє собою вакцину.

Цей винахід також стосується застосування, як тут описано, де лікарський засіб виявляє протиракову активність.

Цей винахід також стосується застосування, як тут описано, де згадані ракові клітини є клітинами раку шлунка, раку шлунково-кишкового тракту, колоректального раку, раку підшлункової залози, легенів або нирок.

Цей винахід також стосується конкретних маркерних білків, які можуть використовуватися в прогнозуванні перебігу захворювання у хворих на рак шлунка.

Крім цього, цей винахід також стосується застосування цих нових мішеней для лікування раку.

Як зазначено тут, в літературі було описано, що білки, які кодуються ABL1, ADAM 10, AHR, CCND2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EIF2S3, LOC255308, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP12, MMP3, MST1R, NUF2, OLFM4, PROM1, RRM2, THY1, TMPRSS4, TOP2A, TSPAN1, WNT5A, HIF1A і PTK2, надмірно експресуються при раку шлунка у порівнянні з нормальними тканинами шлунка та інших органів (наприклад, печінки, нирок, серця).

Було показано, що білки, які кодуються ABL1, ADAM 10, ADAM8, AHR, ASPM, ATAD2, CCDC88A, CCNB1, CCND2, CCNE2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, CLCN3, COL6A3, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HIF1A, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, IQGAP3, ITGB4, KIF11, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP3, MST1R, MUC6, NCAPG, NFYB, NUF2, OLFM4, PBK, PLK4, PPAP2C, PROM1, PTK2, RRM2, SIAH2, THY1, TOP2A, TPX2, TSPAN1, TSPAN8, UBE2S, UCHL5 і WNT5A, відіграють важливу роль в онтогенезі, оскільки вони беруть участь у злоякісному переродженні, рості клітин, проліферації, ангіогенезі або інвазії в нормальні тканини. Існують також деякі докази активності, що пов'язана з захворюванням на рак, у білків, які кодуються DNAJC10, EIF2S3, EIF3L, POLD3, PSMC2, PSMD14 і TMPRSS4.

Було показано, що білки, які кодуються PROM1, WNT5A, SMC4, PPAP2C, GPR38, OLFM4 і THY1, надмірно експресуються та/або відіграють важливу роль у нормальних стовбурових клітинах та/або ракових стовбурових клітинах. Обговорювалася можливість того, що PROM1 є маркером стовбурових клітин ракової пухлини шлунка, хоча результати досить дискусійні. Ракові стовбурові клітини є субпопуляцією пухлинних клітин із потенціалом самовідновлення, що необхідно для росту пухлини. Ці клітини знаходяться у спеціалізованих структурах із високим рівнем організації, так званих нішах ракових стовбурових клітин, необхідних для підтримання потенціалу самовідновлення ракових стовбурових клітин.

Було показано, що надмірна експресія білків AHR, ASPM, ATAD2, CCNB1, CCND2, CCNE2, CDK1 (CDC2), CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HIF1A, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF11, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, LMNB1, MET, MMP11, MMP3, MST1R, MUC6, NCAPG, NUF2, OLFM4, PBK, PPAP2C, PROM1,

PTK2, TMPRSS4, TPX2, TSPAN1 і WNT5A в пухлинах пов'язана з пізніми стадіями захворювання і несприятливим прогнозом для пацієнтів.

Отже, за цим винаходом пропонуються способи ідентифікації тварин, переважно людей, які, ймовірно, хворі на рак шлунка. В одному втіленні ця ймовірність складає від 80 % до 100 %.  
 5 Один такий спосіб включає визначення рівню принаймні одного з білків MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 у зразку пухлинної тканини, взятому у піддослідній тварини. В одному втіленні зразок отримують під час радикальної хірургічної операції. В іншому втіленні зразок отримують за допомогою голкової біопсії.

10 Якщо за результатами визначення рівень MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 у клітинах на 20 % або більше перевищує їх рівень у доброякісних клітинах епітелію того самого зразка, піддослідна тварина ідентифікується як, ймовірно, хвора на рак шлунка.

Чим більше різних білків із групи, що складається з MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6, є надмірно експресованими, тим вище ймовірність того, що піддослідна  
 15 тварина буде ідентифікована як хвора на рак шлунка.

В одному втіленні визначення рівню MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують *in situ*. В іншому втіленні визначення рівню MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують *in vitro*. В ще одному втіленні визначення рівню MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують *in vivo*. У  
 20 переважному втіленні визначення рівню MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують методом лазерного мікровисікання тканин з Вестерн-блот аналізом.

В ще одному втіленні визначення рівнів MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують з використанням антитіл, специфічних до MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6. В іншому втіленні визначення рівнів MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують методом ПЛР із праймером,  
 25 специфічним до мРНК, яка кодує MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6. В іншому втіленні визначення рівнів MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують із нуклеотидним зондом, специфічним до мРНК, яка кодує MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6. В ще одному втіленні визначення рівню MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують  
 30 Нозерн-блот аналізом. В іншому втіленні визначення рівню MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 виконують методом рибонуклеазного захисту. В іншому втіленні для виявлення поліпептидів MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 у зразку біологічної рідини (такої як кров, сироватка, мокротиння, сеча або перитонеальна рідина) використовують імунологічні дослідження, такі як твердофазний імуносорбентний аналіз (ELISA), радіоімуноаналіз (RIA) і Вестерн-блот аналіз. Біоптати, зразки  
 35 тканин і клітин (таких як яєчника, лімфатичних вузлів, зіскоби епітелію з поверхні яєчника, біоптати легенів, печінки і будь-які зразки рідини, які містять клітини (такої як перитонеальна рідина, мокротиння і плевральна рідина) можна перевірити шляхом дезагрегації та/або солюбілізації зразка тканини або клітин і провівши його імуноаналіз на присутність поліпептидів, такий як ELISA, RIA або Вестерн-блот. Такі зразки клітин або тканини можливо також проаналізувати методом на основі використання нуклеїнових кислот, наприклад, зворотної транскрипції - полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) з ампліфікацією, Нозерн-гібридизації або слот- чи дот-блотингу. Для візуалізації розподілу клітин пухлини всередині зразка тканини  
 45 можуть використовуватися діагностичні тести, які зберігають структуру зразка тканини, наприклад, імуногістологічне забарвлювання, гібридизація *in situ* або ЗТ-ПЛР *in situ* з метою виявити поліпептидний маркер раку шлунка або мРНК, відповідно. Для локалізації пухлинних мас *in vivo* можуть використовуватися дослідження з візуалізацією, такі як магнітно-резонансна томографія (МРТ) шляхом введення в організм суб'єкта антитіла, яке специфічно зв'язує поліпептиди MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 (особливо поліпептиди, які локалізовані на поверхні клітин), де антитіло є кон'югованим або в інший спосіб з'єднаним із парамагнітною міткою (або іншим елементом, який можна виявити, залежно від методу візуалізації, що використовується); альтернативно, локалізацію неміченого антитіла, специфічного до пухлинного маркера, можна виявити за допомогою вторинного антитіла,  
 50 з'єданого з елементом, який можна виявити.

Крім того, за цим винаходом також пропонуються химерні/злиті білки/пептиди, що включають поліпептиди MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 і їх фрагменти, включаючи функціональні, протеолітичні і антигенні фрагменти. Партнер по злиттю або сегменти гібридної молекули принагідно постачає епітопи, які стимулюють CD4<sup>+</sup> Т-клітини.  
 60 SO4<sup>+</sup>-стимулюючі епітопи добре відомі фахівцям в цій галузі техніки і включають епітопи, що

були ідентифіковані в правцевому анатоксині. В ще одному переважному втіленні пептид є злитим білком, зокрема, що містить N-термінальні амінокислоти HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii). В одному втіленні пептид за винаходом є усіченим білком людини або злитим білком, отриманим із білкового фрагмента і іншої поліпептидної частки за умови, що

5 частка біологічного компонента людини включає один або більше амінокислотних послідовностей за винаходом.

Антитіла проти поліпептидів MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6, проти химерних/злитих білків/пептидів, що включають поліпептиди MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6, а також проти фрагментів поліпептидів

10 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6, включаючи протеолітичні і антигенні фрагменти, і проти химерних/злитих білків/пептидів, що включають ці фрагменти, також є предметом цього винаходу. Крім того, способи використання таких антитіл для прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак, і на рак шлунка зокрема, також є предметом цього винаходу.

15 Антитіла за винаходом можуть бути поліклональними антитілами, моноклональними антитілами та/або химерними антитілами. Лінії іморталізованих клітин, які продукують моноклональні антитіла за винаходом, також є предметом цього винаходу.

Фахівцю в цій галузі зрозуміло, що в деяких випадках підвищена експресія MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 як ген-маркерів пухлин свідчить про

20 несприятливий прогноз для суб'єктів, хворих на рак шлунка. Наприклад, відносно підвищені рівні експресії MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 можуть бути ознакою відносно великої первинної пухлини, більш високого пухлинного навантаження (наприклад, більшої кількості метастазів) або відносно більш злоякісного фенотипу пухлини.

Чим більше різних білків із групи, що включає MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6, мають надмірну експресію, тим гіршим є прогноз.

25

Діагностичні і прогностичні методи за винаходом включають використання відомих методів, наприклад, методів з використанням антитіл для виявлення поліпептидів MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6, і методів на основі гібридизації та/або ампліфікації нуклеїнових кислот для виявлення мРНК MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C,

30 AVL9, UQCRB і MUC6.

Крім того, оскільки швидке руйнування пухлинних клітин часто приводить до утворення аутоантитіл, маркери раку шлунка за винаходом можливо використовувати в серологічних дослідженнях (наприклад, аналіз зразків сироватки суб'єкта з використанням методу ELISA) для виявлення антитіл проти MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 в організмі суб'єкта. Рівні аутоантитіл, специфічних до поліпептидів MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6, які є принаймні приблизно втричі вищими (і переважно

35 принаймні у 5 або 7 разів вищими, найбільш переважно принаймні у 10 або 20 разів вищими) за рівні у контрольному зразку, є ознакою раку шлунка.

Локалізовані на поверхні клітин, внутрішньоклітинні і секретовані поліпептиди MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 усі можуть бути використані для аналізу біоптатів, наприклад, зразків тканин або клітин (включаючи клітини, отримані зі зразків рідини, такої як перитонеальна рідина) для ідентифікації біоптатів тканин або клітин як такі, що містять клітини раку шлунка. Біоптат може бути проаналізованим у вигляді інтактної тканини чи зразка цільних клітин, або зразок тканини чи клітин може бути дезагредованим та/або солюбілізованим,

45 якщо це необхідно для конкретного виду діагностичного тесту, який треба виконати. Наприклад, біоптати чи зразки можна піддати аналізу у вигляді цільних тканин або цільних клітин на поліпептиди MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 або на рівні мРНК *in situ*, наприклад, використовуючи імуногістохімічні методи, гібридизацію мРНК *in situ* або ЗТ-ПЛР *in situ*. Кваліфікованому фахівцю відомо, як обробити тканини або клітини для аналізу на поліпептиди чи на рівень мРНК імунологічними методами, такими як ELISA, імуноблотинг чи еквівалентними методами, або для аналізу рівнів мРНК методом на основі використання нуклеїнових кислот, такими як ЗТ-ПЛР, Нозерн-гібридизації або слот- чи дот-блотингу.

50

Набори для визначення рівнів експресії MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6.

Предметом цього винаходу є набори для виявлення підвищеного рівня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 як генів-маркерів раку шлунка у суб'єкта. Набір для виявлення полі пептидного маркера раку шлунка переважно містить антитіло, яке специфічно зв'язує вибраний поліпептидний маркер раку шлунка. Набір для виявлення маркера раку шлунка мРНК переважно містить одну або більше нуклеїнових кислот (наприклад, один

60 або більше олігонуклеотидних праймерів або зондів, ДНК-зондів, РНК-зондів або матриць для

синтезу РНК-зондів), які специфічно гібридизуються з мРНК MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6.

Зокрема, набір на основі антитіл може використовуватися для виявлення присутності та/або визначення рівню поліпептиду MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6, специфічно зв'язаного з антитілом або його імунореактивним фрагментом. Набір може містити антитіло, активне відносно антигену, і реагент для виявлення продукту реакції антитіла з антигеном. Такий набір може бути комплектом ELISA і може включати контроль (наприклад, визначену кількість конкретного поліпептидного маркера раку шлунка), за потреби первинні і вторинні антитіла, і будь-які інші необхідні реагенти, такі як компоненти, що аналізують, субстрати ферментів і колірні реагенти, як описано вище. Альтернативно, діагностичний набір може являти собою набір для імуноблот-аналізу, як правило, містить компоненти і реагенти, як тут описано.

Набір на основі нуклеїнових кислот може використовуватися для виявлення та/або визначення рівня експресії MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 шляхом виявлення та/або визначення кількості мРНК MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 у зразку, такому як біоптат тканин або клітин. Наприклад, набір для проведення ЗТ-ПЛР для визначення підвищеної експресії MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 переважно містить олігонуклеотидні праймери у кількості, достатній для проведення зворотної транскрипції мРНК як маркера раку шлунка в кДНК і ПЛР-ампліфікацію кДНК як маркера раку шлунка, і переважно містить також матричні молекули і праймери для проведення відповідних контрольних ПЛР-реакцій і внутрішні контролю для кількісного визначення. Фахівцю в цій галузі зрозуміло, як вибрати відповідні праймери для проведення зворотної транскрипції і ПЛР-реакцій і відповідні контрольні реакції, які необхідно провести. Таку настанову можна знайти, наприклад, у F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1997. Фахівцям в цій галузі техніки відомі численні варіанти проведення ЗТ-ПЛР. Цілеспрямовану доставку імунотоксинів до MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 як до терапевтичних мішеней можливо проводити як метод лікування і профілактики раку шлунка. Наприклад, молекула антитіла, що специфічно зв'язує локалізований на поверхні поліпептид MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6, може бути кон'югованою з радіоізотопом або іншою токсичною сполукою. Кон'югати антитіл вводять суб'єкту, так що зв'язування антитіла з його спорідненим поліпептидом раку шлунка приводить до цілеспрямованої доставки терапевтичної сполуки до клітин раку шлунка, у такий спосіб надаючи лікувальну дію хворим на рак.

Терапевтичним агентом може бути токсин, радіоізотоп, лікарський препарат, хімічна речовина або білок (див., наприклад, Bera et al.). "Pharmacokinetics and antitumor activity of a bivalent disulfide-stabilized Fv immunotoxin with improved antigen binding to erbB2" Cancer Res. 59:4018-4022 (1999)). Наприклад, антитіло може бути зв'язане або кон'юговане з бактеріальним токсином (наприклад, дифтерійним токсином, ендотоксином *Pseudomonas A*, холерним токсином) або рослинним токсином (наприклад, рицином) для цілеспрямованої доставки токсину до клітин, що експресують MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6. Цей імунотоксин може бути доставлений до клітини, і після зв'язування локалізованого на поверхні поліпептидного маркера раку шлунка токсин, кон'югований із антитілом, специфічним до маркера раку шлунка, доставляється до клітини.

Крім того, якщо для будь-якого поліпептиду із MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 існує специфічний ліганд (наприклад, ліганд, що зв'язує білок, локалізований на поверхні клітини), цей ліганд можна використовувати замість антитіла для націлювання токсичної сполуки на клітину раку шлунка, як описано вище.

Термін "антитіла" використовується в тут у широкому сенсі і включає як поліклональні, так і моноклональні антитіла. На додаток до інтактних молекул імуноглобуліну, до терміну "антитіла" також входять фрагменти або полімери цих молекул імуноглобуліну і гуманізовані версії молекул імуноглобуліну, за умови, що вони виявляють будь-які з бажаних властивостей (наприклад, специфічне зв'язування поліпептидного маркера раку шлунка, доставка токсину до клітини раку шлунка, що експресує ген-маркер раку шлунка на підвищеному рівні, та/або інгібування активності поліпептидного маркера раку шлунка), описаних в цьому документі.

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

допомогою технології рекомбінантних ДНК. Наприклад, кДНК, що кодує поліпептид MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6, або його фрагмент, може експресуватися в прокаріотичних клітинах (наприклад, бактерій) або еукаріотичних клітинах (наприклад, клітинах дріжджів, комах або ссавців), після чого рекомбінантний білок можна

5 очистити і використати для отримання препарату моноклональних або поліклональних антитіл, які специфічно зв'язують поліпептидний маркер раку шлунка, що був використаний для отримання антитіл.

Фахівцю в цій галузі відомо, що отримання двох або більше комплектів моноклональних або поліклональних антитіл максимально збільшує ймовірність отримання антитіла, що буде мати

10 специфічність та афінність, необхідні для використання за призначенням (наприклад, для ELISA, імуногістохімічних методів, візуалізації *in vivo*, лікування імунотоксинами. Антитіла досліджують на бажану активність добре відомими методами, відповідно до цілей, у яких мають використовуватися антитіла (наприклад, ELISA, імуногістохімічні методи, імунотерапія тощо; додаткові відомості щодо отримання і перевірки антитіл див., наприклад, Harlow and Lane,

15 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988). Наприклад, антитіла можуть бути досліджені методами ELISA, Вестерн-блотингу, імуногістохімічним забарвлюванням фіксованих формаліном зрізів тканини раку шлунка або замороженої тканини. Після попередніх досліджень *in vitro* антитіла, які мають використовуватися для терапевтичних цілей або для діагностики *in vivo*, досліджують з

20 використанням відомих методів клінічного дослідження.

Термін "моноклональне антитіло" в тому виді, в якому він використовується тут, означає антитіло, отримане із по суті гомогенної популяції антитіл, тобто, індивідуальні антитіла, що складають популяцію, є ідентичними, за винятком мутантних форм, що спостерігаються в природі, які можуть бути присутніми в незначній кількості. Моноклональні антитіла за цим

25 патентом включають "химерні" антитіла, у яких частина важкого та/або легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих із окремого виду, або які належать до окремого класу чи субкласу антитіл, в той час як решта ланцюга (ланцюгів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих із іншого виду або які належать до іншого класу чи субкласу антитіл, а також фрагментів таких антитіл, за

30 умови, що вони виявляють бажану антагоністичну активність (Пат. США 4 816 567).

Моноклональні антитіла за винаходом можуть бути отримані гібридомними технологіями. У гібридомних технологіях мишу або іншу відповідну тварину-хазяїна імунізують імунізуючим агентом для створення лімфоцитів, які продукують або здатні продукувати антитіла, які специфічно зв'язують імунізуючий агент. Альтернативно, лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*.

35

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

40

Методи *in vitro* також придатні для створення одновалентних антитіл. Розщеплення антитіл з метою отримання їх фрагментів, зокрема, Fab-фрагментів, можна провести з використанням стандартних методик, відомих у галузі. Наприклад, розщеплення можна виконати за допомогою папаїну. Приклади розщеплення папаїном описані в заявці WO 94/29348, опублікованій 22

45 грудня 1994 р., і в патенті США 4 342 566. В результаті розщеплення антитіл папаїном зазвичай утворюються два ідентичні антиген-зв'язувальні фрагменти, які звуться Fab-фрагментами, кожний з одним антиген-зв'язувальним сайтом і залишковим Fe фрагментом. Обробка пепсином дає фрагмент, який містить два антиген-зв'язувальних сайти і все ж таки здатні поперечно зшиватися з антигеном.

Фрагменти антитіл, чи то з'єднані з іншими послідовностями, чи ні, можуть також включати вставки, делеції, заміни або інші вибрані модифікації окремих частин або амінокислотних залишків за умови, що активність фрагмента не є значно зміненою або пошкодженою у порівнянні з немодифікованим антитілом або фрагментом антитіла. Ці модифікації можуть надати деякі додаткові властивості, такі як видалити/додати амінокислоти, що здатні до

50 дисульфідного зв'язування, підвищити біологічну довговічність, змінити секреторні властивості тощо. У будь-якому випадку, фрагмент антитіла має виявляти біологічну активність, регулювання зв'язування у зв'язувальному домені тощо. Функціональні або активні центри антитіла можуть бути ідентифіковані шляхом мутагенезу конкретної ділянки білка, з послідуною експресією і перевіркою експресованого поліпептиду. Такі методи є цілком

55

очевидними для фахівця у цій галузі і можуть включати сайт-специфічний мутагенез нуклеїнової кислоти, що кодує фрагмент антитіла.

Антитіла за винаходом можуть додатково включати гуманізовані антитіла або людські антитіла. Гуманізованими формами антитіл нелюдського походження (наприклад, мишині) є химерні імуноглобуліни, ланцюги імуноглобулінів або їх фрагменти (такі як Fv, Fab, Fab<sup>1</sup> та інші антиген-зв'язувальні послідовності антитіл), які містять мінімальну послідовність, отриману з імуноглобуліну нелюдського походження. Гуманізовані антитіла включають імуноглобуліни людини (антитіло-реципієнт), в яких залишки від комплементарної детермінантної групи (CDR) реципієнта заміщені залишками від CDR нелюдського походження (антитіло-донор), такого як від миші, пацюка або кроля, що має бажану специфічність, афінність і зв'язувальну здатність. У деяких випадках, Fv каркасні (FR) залишки імуноглобуліну людини є заміщеними відповідними залишками нелюдського походження. Гуманізовані антитіла можуть включати залишки, які не були виявлені ні в антитілі-реципієнті, ні в імпортованих CDR або послідовностях каркаса. Як правило, гуманізоване антитіло буде містити по суті всі з принаймні одного, а зазвичай двох варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі із ділянок CDR відповідають ділянкам імуноглобуліну нелюдського походження і всі або по суті всі із ділянок FR є ділянками консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Оптимально, якщо гуманізоване антитіло містить також принаймні частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), зазвичай ділянку імуноглобуліну людини.

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

Можуть використовуватися трансгенні тварини (наприклад, миші), які після імунізації набувають здатність продукувати повний спектр людських антитіл в умовах відсутності виробки ендогенного імуноглобуліну. Наприклад, було описано, що гомозиготна делеція гена, що кодує ділянку з'єднання важких ланцюгів антитіла, у химерних клітин і лінії клітин зародків мутантних мишей приводить до повного інгібування виробки ендогенних антитіл. Перенесення генної матриці імуноглобуліну клітин зародків людини приводить до виробки людських антитіл після антигенної стимуляції. Людські антитіла можуть також бути виділені методом фагового дисплея з комбінаторної бібліотеки.

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

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

Ефективні дози і режими дозування для введення антитіл можна визначити емпіричним шляхом, такі визначення знайомі фахівцю в цій галузі. Фахівцю в цій галузі зрозуміло, що дози антитіл, які необхідно вводити, залежать, наприклад, від суб'єкта, який отримує антитіла, шляху введення, конкретного типу використовуваних антитіл та інших лікарських препаратів, які вводяться. Типова щоденна доза при застосуванні антитіл як монотерапії може становити від приблизної мкг/кг до 100 мг/кг маси тіла або більше на добу, залежно від вищезгаданих

факторів. Після введення антитіл з метою лікування раку шлунка ефективність терапевтичної дії антитіл можна оцінити різними способами, відомими фахівцю в цій галузі. Наприклад, розмір, кількість та/або розподіл ракових пухлин у шлунку суб'єкта, що отримує лікування, можна контролювати за допомогою стандартних методик візуалізації пухлин. Введене з

5

терапевтичними цілями антитіло, яке затримує ріст пухлини, приводить до скорочення пухлини та/або запобігає розвитку нових пухлин у порівнянні з перебігом захворювання, який би спостерігався за відсутності введення антитіла, є ефективним антитілом для лікування раку шлунка.

10

Оскільки було показано, що білки ABL1, ADAM 10, AHR, CCND2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, COL6A3, EIF2S3, LOC255308, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HMMR, HSP90B1, 1GF2BP3, ITGB4, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP1, MMP12, MMP3, MST1R, NUF2, OLFM4, PROM1, RRM2, THY1, TMPRSS4, TOP2A, TSPAN1, WNT5A, H1F1A і PTK2, експресуються на високому рівні принаймні у тканинах при одному різновиді раку шлунка у порівнянні з нормальними тканинами шлунка, інгібування їхньої експресії або

15

активності може бути частиною терапевтичної стратегії при лікуванні або профілактиці раку шлунка.

Принцип антисенс-терапії базується на гіпотезі, що специфічне відносно послідовності пригнічення експресії генів (через транскрипцію або трансляцію) можливо досягти шляхом внутрішньоклітинної гібридизації між геномною ДНК або мРНК і комплементарними

20

антисенсовими сполуками. Утворення такого гібридного дуплексу нуклеїнових кислот заважає транскрипції геномної ДНК, яка кодує пухлинний антиген-мішень, або процесингу/транспорту/трансляції та/або стабільності мРНК пухлинного антигену-мішені.

Антисенсові нуклеїнові кислоти можуть бути доставлені з використанням багатьох підходів. Наприклад, антисенсові олігонуклеотиди або антисенсові РНК можуть бути введені

25

безпосередньо (наприклад, як внутрішньовенна ін'єкція) суб'єкту у формі, яка забезпечує поглинання клітинами пухлини. Як альтернатива, можна ввести в клітини *in vivo* вірусні або плазмідні вектори, що кодують антисенсові РНК (або фрагменти РНК). Антисенс-ефекту можна також досягти сенс-послідовностями, однак ступінь фенотипічних змін є дуже непостійним. Фенотипічні зміни, спричинені ефективною антисенс-терапією, оцінюються згідно зі змінами у,

30

наприклад, рівнях мРНК-мішені, рівнях білка-мішені та/або рівнях активності білка-мішені.

У конкретному прикладі інгібування функції маркера пухлини шлунка шляхом генної терапії з використанням антисенсових конструкцій можна досягти безпосереднім введенням антисенсового РНК-маркера пухлини шлунка. Антисенсовий РНК-маркер пухлини шлунка можна отримати і виділити стандартною методикою, але найбільш легко його отримати транскрипцією

35

*in vitro* з використанням антисенсового кДНК-маркера пухлини шлунка під контролем вискоєфективного промотору (наприклад, T7-промотору). Введення антисенсового РНК-маркера пухлини шлунка у клітини можна провести будь-яким методом, який застосовують для безпосереднього введення нуклеїнових кислот, як описано нижче.

40

Альтернативна стратегія інгібування функцій MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 за допомогою генної терапії включає внутрішньоклітинну експресію антитіл проти MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 або фрагментів антитіл проти MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6. Наприклад, ген (або фрагмент гену), що кодує моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з поліпептидом

45

MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 і інгібує його біологічну активність, ставлять під транскрипційний контроль регуляторної послідовності специфічного (наприклад, тканино-або пухлино-специфічного) гену в межах вектора експресії нуклеїнової

50

кислоти. Вектор потім вводять суб'єкту таким чином, щоби він поглинався клітинами раку шлунка або іншими клітинами, які після цього секретують антитіла проти MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6 і у такий спосіб блокують біологічну активність

50

поліпептиду MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6. Переважно, якщо поліпептиди MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 присутні на зовнішній поверхні клітин раку шлунка.

50

У методах, що описані вище, які включають введення і поглинання екзогенної ДНК клітинами суб'єкту (наприклад, трансдукція або трансфекція гену), нуклеїнові кислоти за

55

винаходом можуть бути присутніми у вигляді "оголеної" ДНК або нуклеїнові кислоти можуть міститися у векторі для доставки нуклеїнових кислот до клітин для інгібування експресії білка-маркера раку шлунка. Згаданий вектор може бути комерційно доступним препаратом, таким як аденовірусний вектор (Quantum Biotechnologies, Inc., Лаваль, Квебек, Канада). Доставка нуклеїнової кислоти або вектора до клітин може здійснюватися за багатьма механізмами. Як

60

один приклад, доставка може здійснюватися ліпосомами, з використанням комерційно

доступних ліпосомних препаратів, таких як ліпофектин, ліпофектамін (GIBCO- 25 BRL, Inc., Гейтерсберг, Меріленд, США), суперфект (Qiagen, Inc., Гільден, Німеччина) і трансфектам (Promega Biotec, Inc., Медісон, Вісконсин, США), а також іншими ліпосомами, які були отримані згідно зі стандартними для цієї галузі методиками. Крім того, нуклеїнова кислота або вектор за цим винаходом може бути доставлений *in vivo* електропорацією, технологією, доступною у компанії Genetronics, Inc. (Сан-Дієго, Каліфорнія, США), а також за допомогою апарату для сонопорації (ImaRx Pharmaceutical Corp., Таксон, Аризона, США).

Як ще один приклад, доставка за допомогою вектору може здійснюватися через вірусну систему, наприклад, ретровірусну векторну систему, що може пакувати рекомбінантний ретровірусний геном. Рекомбінантний ретровірус може потім бути використаний для інфікування і, у такий спосіб, доставляти до інфікованої клітини антисенсову нуклеїнову кислоту, що інгібує експресію MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB або MUC6. Точний метод введення зміненої нуклеїнової кислоти в клітини ссавців, звичайно, не обмежується використанням ретровірусних векторів. У широкому доступі є інші методики для цієї процедури, включаючи використання аденовірусних векторів, адено-асоційованих вірусних (AAV) векторів, лентивірусних векторів, псевдотипованих ретровірусних векторів. Можна використовувати також методики фізичної трансдукції, такі як доставка ліпосомами і рецептор-опосередковані та інші механізми ендоцитозу. Цей винахід може використовуватися у комбінації з будь-яким із таких або інших зазвичай використовуваних методів перенесення генів.

Ці антитіла можуть використовуватися також для діагностики *in vivo*. Зазвичай антитіла мітять радіонуклідами (такими як  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  or  $^{35}\text{S}$ ), так щоби пухлину можна було локалізувати, використовуючи імуносцинтиграфію. В одному з втілень антитіла або їх фрагменти зв'язуються з зовнішньоклітинними доменами двох або більше таких мішеней, як MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6 і константою зв'язування ( $K_d$ ), меншою ніж  $1 \times 10$  мкМ.

Антитіла для діагностичного застосування можна мітити зондами, що підходять для виявлення різними методами візуалізації. Методи виявлення зондів включають, але не обмежуються ними, флуоресценцію, світлову, конфокальну і електронну мікроскопію, магнітно-резонансну візуалізацію і спектроскопію, флуороскопію, комп'ютерну томографію та позитронну емісійну томографію. Відповідні зонди включають, але не обмежуються ними, флуоресцеїн, родамін, еозин та інші флуорофори, радіоізотопи, золото, гадоліній та інші лантаноїди, парамагнітне залізо, фтор-18 та інші радіонукліди, що випромінюють позитрони. Крім цього, зонди можуть бути бі- або багатофункціональними і виявлятися більш ніж одним із зазначених методів. Ці антитіла можуть бути безпосередньо або опосередковано мічені вищезгаданими зондами. Прикріплення зондів до антитіл включає ковалентне зв'язування зонда, включення зонда в антитіло і ковалентне прикріплення хелатуючої сполуки для зв'язування зонда, серед інших добре відомих фахівцю у цій галузі. У разі імуногістохімічних методів зразок хворої тканини може бути свіжим чи замороженим або може бути залитим у парафін і фіксованим за допомогою консерванту, такого як формалін. Фіксовані або залиті зразки зрізів тканин приводять у контакт із міченим первинним антитілом і вторинним антитілом, де антитіло використовується для виявлення експресованих *in situ* білків MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6.

Отже, цей винахід також має відношення до пептиду, що включає послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95 або її варіант, який на 85 %, переважно на 90 % і більш переважно на 95 % є гомологічним послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95 або її варіанту, який викликає перехресну реакцію Т-клітин із зазначеним пептидом.

Пептиди за винаходом здатні зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) класу-I людини.

У цьому винаході термін "гомологічний" означає ступінь ідентичності послідовностей двох амінокислотних послідовностей, тобто, пептидних або поліпептидних послідовностей. Згадана вище "гомологія" визначається порівнянням двох послідовностей, що були вирівняні в оптимальних умовах щодо послідовностей, які порівнюються. Послідовності, які тут порівнюються, можуть мати вставки чи делеції (наприклад, розрив і т.п.) при оптимальному вирівнюванні двох послідовностей. Таку гомологічність послідовностей можна розрахувати, створивши вирівнювання за допомогою, наприклад, алгоритму ClustalW. Загальнодоступне програмне забезпечення для аналізу послідовностей, більш конкретно, Vector NTI, GENETYX або інструменти для аналізу можна знайти у базах даних у вільному доступі.



Фахівець у цій галузі в змозі оцінити, чи будуть Т-клітини, індуковані варіантом конкретного пептиду, вступати в перехресну реакцію із зазначеним пептидом ((Fong і співавт., 8809-14) (Arrau і співавт., 1805-14; Colombetti і співавт., 2730-38; Zarembo і співавт., 4570-77).

Під терміном "варіант" даної амінокислотної послідовності автори винаходу мають на увазі, що бокові ланцюги, наприклад, одного чи двох амінокислотних залишків змінюються (зокрема, шляхом заміни їх боковим ланцюгом іншого природно існуючого амінокислотного залишку чи якимось іншим боковим ланцюгом) таким чином, що пептид все ще здатний зв'язуватися з молекулою HLA, по суті, у такий же спосіб, як і пептид, що складається з даної амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 33. Наприклад, пептид може бути модифікований так, що він буде принаймні зберігати, чи навіть поліпшувати, здатність взаємодіяти та зв'язуватися зі зв'язувальною щільною прийнятною молекулою MHC, такою як HLA-A\*02 або -DR, і у такий спосіб принаймні зберігати, чи навіть поліпшувати, здатність зв'язуватися з ТКР активованого ЦТЛ.

Ці ЦТЛ можуть згодом вступати в перехресну реакцію із клітинами і знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду як визначено в аспектах винаходу. Як можна дізнатися з наукових публікацій (Rammensee, Bachmann і Stevanovic) і баз даних (Rammensee і співавт., 213-19), окремі позиції пептидів, що зв'язують HLA, є типово якірними залишками, які формують корову послідовність, що відповідає зв'язувальному мотиву рецептора HLA, який визначається полярністю, електрофізичними, гідрофобними властивостями і просторовою структурою поліпептидних ланцюгів, що утворюють зв'язувальну щільну. Отже, фахівець у цій галузі зможе модифікувати амінокислотну послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95, зберігаючи відомі якірні залишки, і буде здатний визначити, чи зберігають такі варіанти здатність зв'язувати молекули MHC класу I або II. Варіанти за цим винаходом зберігають здатність зв'язуватися з ТКР активованого ЦТЛ, який потім може вступати в перехресну реакцію з- і знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду як визначено в аспектах винаходу.

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

Таблиця 3:

Варіанти і мотив пептидів відповідно до SEQ ID NO: від 1 до 33

	Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	Код пептиду	L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
SEQ ID NO: 1	Варіанти		F								
											L
											I
			F								L
			F								1
	Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	Код пептиду	S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
SEQ ID NO: 2	Варіанти		F								
										I.	

35

											F	
				F							L	
				F							F	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UCHL5-001	Код пептиду		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
SEQ ID NO: 3	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	Код пептиду		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
SEQ ID NO: 4	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PROM-001	Код пептиду		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
SEQ ID NO: 5	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	Код пептиду		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F
SEQ ID NO: 6	Варіанти			Y								
				F								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
				F								L
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MST1R-001	Код пептиду		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F	
SEQ ID NO: 7	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NFYB-001	Код пептиду		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I	
SEQ ID NO: 8	Варіанти			F								
											L	
											F	
				F							L	
				F							F	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SMC4-001	Код пептиду		н	Y	к	P	T	P	L	Y	F	
SEQ ID NO: 9	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							L	

		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UQCRB-001	Код пептиду		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L
SEQ ID NO: 10	Варіанти			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PPAP2C-001	Код пептиду		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L	
SEQ ID NO: 11	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
AVL9-001	Код пептиду		F	Y	I	S	P	V	N	K	L	
SEQ ID NO: 12	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-001	Код пептиду		V	Y	G	I	R	L	E	H	F	
SEQ ID NO: 13	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABL1-001	Код пептиду		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L	
SEQ ID NO: 14	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MUC-006	Код пептиду		N	Y	E	E	T	F	P	H	I	
SEQ ID NO: 15	Варіанти			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-001	Код пептиду		R	Y	L	W	A	T	V	T	I	
SEQ ID NO: 16	Варіанти			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EPHA2-005	Код пептиду		V	Y	F	S	K	S	E	Q	L	
SEQ ID NO: 17	Варіанти			F								
											F	

											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MMP3-001	Код пептиду		V	F	I	F	K	G	N	Q	F	
SEQ ID NO: 18	Варіанти			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-002	Код пептиду		R	F	L	S	G	I	I	N	F	
SEQ ID NO: 19	Варіанти			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PLK4-001	Код пептиду		Q	Y	A	S	R	F	V	Q	L	
SEQ ID NO: 20	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-002	Код пептиду		к	Y	L	T	V	K	D	Y	L	
SEQ ID NO: 21	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	i	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL12A1-001	Код пептиду		V	Y	N	P	T	P	N	S	L	
SEQ ID NO: 22	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL6A3-001	Код пептиду		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
SEQ ID NO: 23	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	Код пептиду		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
SEQ ID NO: 24	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	Код пептиду		Y	Y	K	N	I	G	L	G	F	

SEQ ID NO: 25	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-001	Код пептиду		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
SEQ ID NO: 26	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	Код пептиду		L	Y	P	E	V	F	E	K	F	
SEQ ID NO: 27	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HSP90B1-001	Код пептиду		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F
SEQ ID NO: 28	Варіанти			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SIAH2-001	Код пептиду		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F
SEQ ID NO: 29	Варіанти			Y								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SLC6A6-001	Код пептиду		V	Y	P	N	W	A	I	G	L	
SEQ ID NO: 30	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IQGAP3-001	Код пептиду		V	Y	к	V	V	G	N	L	L	
SEQ ID NO: 31	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ERBB3-001	Код пептиду		V	Y	I	E	K	N	D	K	L	
SEQ ID NO: 32	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	

		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KIF2C-001	Код пептиду		I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L
SEQ ID NO: 33	Варіанти			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	Код пептиду		L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
SEQ ID NO: 1	Варіанти			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	Код пептиду		S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
SEQ ID NO: 2	Варіанти			F								
												L
												F
				F								L
				F								F
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UCHL5-001	Код пептиду		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
SEQ ID NO: 3	Варіанти			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	Код пептиду		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
SEQ ID NO: 4	Варіанти			F								
												L
												I
				F								F
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PROM-001	Код пептиду		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
SEQ ID NO: 5	Варіанти			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	Код пептиду		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F

SEQ ID NO: 6	Варіанти			Y								
				F								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
				F								L
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MST1R-001	Код пептиду		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F	
SEQ ID NO: 7	Варіанти			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NFYB-001	Код пептиду		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I	
SEQ ID NO: 8	Варіанти			F								
												L
												F
				F								L
				F								F
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SMC4-001	Код пептиду		n	Y	k	P	T	P	L	Y	F	
SEQ ID NO: 9	Варіанти			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UQCRB-001	Код пептиду		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L
SEQ ID NO: 10	Варіанти			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PPAP2C-001	Код пептиду		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L	
SEQ ID NO: 11	Варіанти			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
AVL9-001	Код пептиду		F	Y	I	S	P	V	N	K	L	
SEQ ID NO: 12	Варіанти			F								
												F
												I
				F								F
				F								1
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-001	Код пептиду		V	Y	G	I	R	L	E	H	F	
SEQ ID NO: 13	Варіанти			F								
												L
												I
				F								L
				F								I

		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABL1-001	Код пептиду		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L	
SEQ ID NO: 14	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	

		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MUC-006	Код пептиду		N	Y	E	E	T	F	P	H	I	
SEQ ID NO: 15	Варіанти			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-001	Код пептиду		R	Y	L	W	A	T	V	T	I	
SEQ ID NO: 16	Варіанти			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EPHA2-005	Код пептиду		V	Y	F	S	K	S	E	O	L	
SEQ ID NO: 17	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MMP3-001	Код пептиду		V	F	I	F	K	G	N	Q	F	
SEQ ID NO: 18	Варіанти			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-002	Код пептиду		R	F	L	S	G	I	1	N	F	
SEQ ID NO: 19	Варіанти			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PLK4-001	Код пептиду		Q	Y	A	S	R	F	V	Q	L	
SEQ ID NO: 20	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-002	Код пептиду		K	Y	L	T	V	K	D	Y	L	
SEQ ID NO: 21	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	



		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL12A1-001	Код пептиду		V	Y	N	P	T	P	N	S	L	
SEQ ID NO: 22	Варіанти			F								
											F	
											I	

				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL6A3-001	Код пептиду		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
SEQ ID NO: 23	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							1	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	Код пептиду		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
SEQ ID NO: 24	Варіанти			F								
											L	
											1	
				F							L	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	Код пептиду		Y	Y	к	N	I	G	L	G	F	
SEQ ID NO: 25	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							L	
				I							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-001	Код пептиду		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
SEQ ID NO: 26	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				1							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	Код пептиду		L	Y	p	E	V	F	E	K	F	
SEQ ID NO: 27	Варіанти			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							1	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HSP90B1-001	Код пептиду		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F
SEQ ID NO: 28	Варіанти			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SIAH2-001	Код пептиду		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F
SEQ ID NO: 29	Варіанти			Y								
												L
												1
				Y								L
				Y								I

		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SLC6A6-001		Код пептиду	V	Y	P	N	W	A	I	G	L	
SEQ ID NO: 30	Варіанти			F								

											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IQGAP3-001		Код пептиду	V	Y	K	V	V	G	N	L	L	
SEQ ID NO: 31	Варіанти			F								
											F	
											I	
				1							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ERBB3-001		Код пептиду	V	Y	I	E	K	N	D	K	L	
SEQ ID NO: 32	Варіанти			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KIF2C-001		Код пептиду	I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L
SEQ ID NO: 33	Варіанти			F								
												F
												I
				F								F
				F								I

Більш довгі пептиди також можуть бути підходящими. Також можливо, щоби епітопи комплексу MHC I класу, хоча вони мають зазвичай довжину 8-11 амінокислот, утворювались шляхом процесингу з більш довгих пептидів чи білків, які включають фактичний епітоп. Бажано, щоби бокові залишки фактичного епітопу не завдавали значного впливу на протеолітичне розщеплення, необхідне для презентування фактичного епітопу під час процесингу.

Відповідно, цей винахід також пропонує пептиди та варіанти епітопів комплексу MHC I класу, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину від 8 до 100, переважно від 8 до 30, та найбільш переважно від 8 до 14, а саме, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 амінокислот.

Звичайно, пептид чи його варіант відповідно до цього винаходу матимуть здатність зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (MHC) людини I класу. Зв'язування пептиду чи його варіанту з комплексом MHC може бути перевірене за допомогою методів, добре відомих в цій галузі.

У особливо переважному втіленні цього винаходу пептид по суті складається з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95.

"По суті складається з" означає, що пептид за винаходом, на додаток до послідовності відповідно до будь-якої послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95 чи його варіант, містить додаткові N- та/або C-термінальні фрагменти послідовності амінокислот, які не обов'язково формують частину пептиду, що функціонує як епітоп для молекул MHC.

Проте ці фрагменти можуть бути важливими для забезпечення ефективного введення пептиду відповідно до цього винаходу в клітини. В одному з втілень цього винаходу пептид є гібридним білком, який вміщує, наприклад, 80 N-термінальних амінокислот HLA-DR-антиген-асоційованого інваріантного ланцюгу (p33, надалі "ІГ"), одержаного з NCBI, інвентарний номер в генному банку (GenBank) X00497.

Крім того, пептид чи його варіант може бути додатково модифікований для поліпшення його стабільності та/або зв'язку з молекулами MHC, щоб викликати сильнішу імунну відповідь. Методи для такої оптимізації пептидної послідовності добре відомі в цій галузі та включають, наприклад, введення реверсованих пептидних зв'язків чи непептидних зв'язків.

В реверсованому пептидному зв'язку амінокислотні залишки не з'єднуються пептидними зв'язками (-CO-NH-), а пептидний зв'язок реверсується. Такі ретро-інверсивні пептидні міметики

можуть бути отримані методами, відомими в даній галузі, наприклад, описаними в роботі Meziere et al (1997) .1. Immunol. 159, 3230-3237, яка включена в даний документ шляхом посилання. Такий підхід включає формування псевдо-пептидів, які містять зміни із залученням остова, а не орієнтації бокових ланцюгів. Автори Meziere і співавт., (1997) показують, що для

5 відповіді МНС і Т-клітин-хелперів зазначені псевдо-пептиди є прийнятними. Ретро-інверсивні пептиди, які вміщують зв'язки NH-CO замість пептидних зв'язків CO-NH, набагато більш стійкі до протеолізу.

Непептидний зв'язок - це, наприклад, -CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>-, та -CH<sub>2</sub>SO-. У патенті США 4 897 445 пропонується метод твердофазного синтезу

10 непептидних зв'язків (-CH<sub>2</sub>-NH) в поліпептидних ланцюгах, що включає поліпептиди, синтезовані за допомогою стандартних методик, та непептидний зв'язок, синтезований шляхом реакції аміноальдегіду та амінокислоти в присутності NaCNBbb.

Пептиди, що включають послідовності, описані вище, можуть бути синтезовані з додатковими хімічними групами, присутніми на їхніх аміно- та/або карбоксильних кінцях, для

15 посилення стабільності, біологічної доступності та/або афінності пептидів. Наприклад, гідрофобні групи, такі як карбобензоксильні, данзильні чи t-бутилоксикарбонільні, можуть додаватися до аміно-кінців пептидів. Подібним чином, на аміно-кінцях пептидів може розміщуватись ацетильна група чи 9-фторенілметоксикарбонільна група. До карбоксильних кінців пептидів може бути додана також гідрофобна група, трет-бутилоксикарбонільна чи амідогрупа.

Крім того, пептиди за винаходом можуть бути синтезовані для зміни їхньої стеричної конфігурації. Наприклад, може використовуватися D-ізомер одного чи кількох амінокислотних залишків пептиду, а не звичайний L-ізомер. До того ж, принаймні один з амінокислотних залишків пептидів за винаходом може замінюватись одним з добре відомих амінокислотних

25 залишків неприродного походження. Такі заміни можуть служити для підвищення стабільності, біологічної доступності та/або функції зв'язування пептидів за винаходом.

Подібним чином, пептид чи його варіант за винаходом може модифікуватися хімічно, шляхом реакції окремих амінокислот до чи після синтезу пептиду. Приклади таких модифікацій добре відомі в цій галузі та узагальнені, зокрема, в роботі R. Lundblad, Chemical Reagents for

30 Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005, яка включена в цей документ шляхом посилання. Хімічна модифікація амінокислот включає, але не обмежується ними, модифікацію шляхом ацилювання, амідинування, піридоксилування лізину, відновлювального алкілювання, тринітробензилування аміногруп 2,4,6-тринітробензолсульфоною кислотою (TNBS), амідну модифікацію карбоксильних груп та сульфгідрильну модифікацію шляхом окиснення пермурашиною кислотою цистеїну в цистеїнову кислоту, формування похідних ртуті, утворення змішаних дисульфідів з іншими тільними сполуками, реакцію з імідом малеїнової кислоти, карбоксиметилування йодоцтовою кислотою чи йодацетамідом та карбамоїлування ціанатом при лужному pH, хоча способи модифікації не обмежуються наведеними тут. В цьому

35 відношенні досвідчений фахівець повинен звернутися до Глави 15 роботи Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) ), де викладена детальна методика відносно хімічної модифікації білків.

Стикло, модифікація, наприклад, ангінільних залишків часто базується на реакції віцинальних дикарбонільних сполук, таких як фенілглюксаль, 2,3-бутандіон і 1,2-циклогександіон з утворенням аддукту. Іншим прикладом є реакція метилглюксалю з

45 аргініновими залишками. Цистеїн може бути модифікований без супутньої модифікації інших нуклеофільних сайтів, таких як лізин та гістидин. В результаті велика кількість реагентів є доступними для модифікації цистеїну. Веб-сайти таких компаній, як Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>), надають інформацію щодо конкретних реагентів.

Селективне відновлення дисульфідних зв'язків також є поширеним. Дисульфідні зв'язки

50 можуть утворюватися і окислюватися під час теплової обробки біофармацевтичних препаратів.

К-реагент Вудворда може використовуватися для модифікації деяких залишків глутамінової кислоти. N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіїмід може використовуватися для утворення внутрішньомолекулярних зшивок між залишками лізину і глутамінової кислоти.

Наприклад, діетилпірокарбонат є реагентом для модифікації гістидильних залишків у білках.

55 Для модифікації гістидину може також використовуватися 4-гідрокси-3-ноненаль.

Реакція залишків лізину та інших альфа-аміногруп є, наприклад, прийнятною для зв'язування пептидів до поверхонь або поперечного зшивання білків/пептидів. Лізин є сайтом для прикріплення поліетиленгліколю і головним сайтом модифікації при глікозилюванні білків.

Метіонінові залишки у білках можна модифікувати, наприклад, йодацетамідом, брометиламіном і хлораміном Т.

60

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

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

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

Пептид чи його варіант, де пептид є модифікованим або включає непептидні зв'язки, є переважним втіленням цього винаходу. Загалом, пептиди і їхні варіанти (принаймні такі, що містять пептидні зв'язки між амінокислотними залишками) можуть бути синтезовані Fmoc-поліамідним методом твердофазного синтезу пептидів, як це розкрито у роботі Lu і співавт., 1981) і в посиланнях, що є в ній. Тимчасовий захист N-аміногрупи забезпечується 9-флуоренілметилоксикарбонільною (Fmoc) групою. Повторювальне розщеплення цієї дуже нестійкої до дії луг захисної групи виконується за допомогою 20 % піперидину у N,N-диметилформаміді. Можна захистити функціональні групи бокових ланцюгів, такі як бутилові етери (у випадку серину, треоніну та тирозину), бутилові естери (у випадку глутамінової кислоти і аспарагінової кислоти), бутилоксикарбонільне похідне (у випадку лізину і гістидину), тритильне похідне (у випадку цистеїну) і 4-метокси-2,3,6-триметилбензосульфонільне похідне (у випадку аргініну). У сполуках, в яких C-термінальними залишками є глутамін або аспарагін, для захисту амідогруп бокових ланцюгів використовують 4,4'-диметоксибензгідрильну групу. Основою твердофазного носія є полідиметилакриламідний полімер, що складається з трьох мономерів: 25 диметилакриламиду (каркасний мономер), біс-акрилоїлетилендіаміну (компонент для перехресного зшивання) і акрилоїлсаркозинметилового естеру (функціоналізуючий агент). Як відділюваний агент, що зв'язує пептид і смолу, використовується нестійке до дії кислот похідне 4-гідроксиметилфеноксоцтової кислоти.

Всі амінокислотні похідні додають у вигляді заздалегідь синтезованих симетричних ангідридних похідних за винятком аспарагіну і глутаміну, які додають з використанням зворотної N,N-дициклогексилкарбодіімід/і-гідроксибездотриазол-опосередкованої реакції сполучення.

Усі реакції сполучення і зняття захисту відслідковували за допомогою нінгідрину, тринітробензолсульфонової кислоти і методу контролю з ізотином. Після завершення синтезу пептиди відщеплюють від смоли-носія з супутнім видаленням захисних груп бокових ланцюгів шляхом обробки 95 % трифтороцтовою кислотою, що містить 50% суміші поглиначів. Зазвичай використовувані поглиначі включають етандіол, фенол, анізол і воду, конкретний вибір залежить від амінокислотних складових пептиду, що синтезується. Для синтезу пептидів можливе також використання комбінації твердофазних і рідкофазних методик (див., наприклад 40 (Bruckdorfer, Marder і Albericio 29-43) і посилання, наведені в цій роботі).

Трифтороцтову кислоту видаляють випаровуванням у вакуумі з подальшим подрібнюванням із діетиловим етером, що забезпечує отримання сирого пептиду. Будь-які поглиначі, які присутні в матеріалі, видаляються простою процедурою екстракції, яка після ліофілізації водної фази дозволяє отримати сирий пептид, вільний від поглиначів. Реагенти для синтезу пептидів, як правило, можна придбати, наприклад, у компанії Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Велика Британія.

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

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

Згідно з ще одним аспектом винаходу пропонується нуклеїнова кислота (наприклад, полінуклеотид), що кодує пептид чи його варіант за винаходом. Полінуклеотид може бути, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, СНК, РНК чи їхньою комбінацією, як одноланцюговою, так і/або дволанцюговою, або природними чи стабілізованими формами полінуклеотидів, такими як,

наприклад, полінуклеотиди з фосфоротіоатним скелетом; він може містити або не містити інтрони, за умови, що він кодує пептид. Звичайно, тільки ті пептиди, що містять природно існуючі амінокислотні залишки, з'єднані природними пептидними зв'язками, кодуються полінуклеотидом. Згідно з ще одним аспектом винаходу, пропонується вектор експресії, здатний експресувати поліпептид відповідно до винаходу.

Були розроблені різні методи для зв'язування полінуклеотидів, особливо ДНК, з векторами, наприклад, через комплементарні липкі кінці. Наприклад, до сегменту ДНК можуть бути додані комплементарні гомополімерні ділянки, щоби вставити у векторну ДНК. Векторна ДНК і сегмент ДНК потім з'єднуються через водневий зв'язок між комплементарними гомополімерними хвостами з утворенням молекул рекомбінантної ДНК.

Синтетичні лінкери, що містять один або більше сайтів рестрикції, дають можливість скористатися альтернативним методом приєднання сегменту ДНК до векторів. Синтетичні лінкери, що містять різні сайти рестрикції ендонуклеази, є комерційно доступними з багатьох джерел, включаючи компанію International Biotechnologies Inc, Нью-Хевен, Коннектикут, США.

У бажаному методі модифікації ДНК, що кодує поліпептид за винаходом, використовується полімеразна ланцюгова реакція, як це розкрито в роботі (Saiki і співавт., 487-91)). Цей метод можна використовувати для введення ДНК у відповідний вектор, наприклад, конструюванням у відповідні сайти рестрикції, або його можна використати для модифікації ДНК у інший прийнятний спосіб, відомий фахівцям у цій галузі. Якщо використовуються вірусні вектори, переважними є поксвірус або аденовірус.

ДНК (або, у випадку ретровірусних векторів, РНК) можуть експресуватися у відповідному хазяїні, щоб продукувати поліпептид, що містить пептид або варіант за винаходом. Отже, ДНК, що кодує пептид або варіант за винаходом, може застосовуватися згідно з відомими методами, належним чином модифікованими з точки зору ідей, що викладені у цьому документі, для конструювання вектора експресії, який потім використовується для трансформації відповідних клітин-хазяїв таким чином, щоб вони набули здатність експресувати і виробляти пептиди за винаходом. Такі методики включають методики, розкриті у патентах США 4 440 859, 4 530 901, 4 582 800, 4 677 063, 4 678 751, 4 704 362, 4 710 463, 4 757 006, 4 766 075 і 4 810 648.

ДНК (або, у випадку ретровірусних векторів, РНК), які кодують поліпептиди, що складають сполуку за винаходом, можуть бути з'єднані з дуже багатьма послідовностями інших ДНК для введення у відповідного хазяїна. Супутня ДНК залежить від природи хазяїна, способу введення ДНК хазяїну і від того, необхідне утримання в епісомальній чи інтегрованій формі.

Здебільшого ДНК вводиться у вектор експресії, такий як плазміда, в належній орієнтації та з відповідною рамкою читування для експресії. При необхідності ДНК може зв'язуватися з належними нуклеотидними послідовностями транскрипційного і трансляційного регуляторного контролю, що розпізнаються бажаним хазяїном, хоча такі контрольні елементи взагалі є доступними у векторі експресії. Вектор згодом вводиться хазяїну із використанням стандартних методик. Загалом, не всі хазяї трансформуються вектором. Отже, необхідно виділити трансформовані клітини. Одна з методик селекції включає введення до складу вектора експресії послідовності ДНК із будь-якими необхідними контрольними елементами, яка кодує вибрану ознаку у трансформованій клітині, таку як резистентність до антибіотиків.

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

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

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

Типова векторна плазміда клітин ссавців для конститутивної експресії включає вірус CMV або промотор SV40 з відповідним поліаденільним хвостом poly(A)-tail і маркером резистентності, таким є неоміцин. Одним із прикладів є pSVL, доступний від компанії Pharmacia, Піскатеуей, Нью-Джерсі, США. Прикладом вектора індукційної експресії у ссавців є pMSG, також доступний від компанії Pharmacia. Корисними є плазмідні вектори дріжджів pRS403-406 і pRS413-416, які доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Каліфорнія, США. Плазміди pRS403, pRS404, pRS405 і pRS406 є дріжджовими інтегруючими плазмідами (YIp) і включають дріжджові селективні маркери HIS3, TRP1, LEU2 і URA3. Плазміди pRS413-416 є дріжджовими плазмідами з центромерами (Yep). Вектори на базі промотору CMV (наприклад,

від компанії Sigma-Aldrich) забезпечують тимчасову або стабільну експресію, цитоплазматичну експресію або секрецію і N-термінальне або C-термінальне мічення для різних комбінацій FLAG, 3xFLAG, c-myc або MAT. Ці злиті білки можна використовувати для виявлення, очищення і аналізу рекомбінантного білка. Злиття з використанням двох міток забезпечує гнучкість під час виявлення.

Сильна регуляторна область промотора цитомегаловірусу (CMV) підвищує рівні конститутивної експресії білка у клітинах лінії COS до таких високих значень, як 1 мг/л. У разі не таких активних ліній клітин рівні білка зазвичай становлять ~0,1 мг/л. Присутність ділянки початку реплікації у фрагменті SV40 приводить до високих рівнів реплікації ДНК у пермісивних клітинах COS. Вектори CMV, наприклад, можуть містити рMB1 (похідне рBR322) ділянку початку реплікації у клітинах бактерій, ген бета-лактамази для вибору резистентності бактерій до ампіциліну, *polyA* людського гормону росту і ділянку початку реплікації f1. Вектори, що містять лідерну послідовність препротрипсину (PPT), можуть направляти секрецію злитих білків FLAG в культуральному середовищі на очищення антитіл проти FLAG, смол і пластинок. Інші вектори і експресійні системи також добре відомі у цій галузі для використанні у багатьох клітинах-хазяїнах.

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

Трансформація відповідних клітин-хазяїв за допомогою ДНК-конструкції за цим винаходом здійснюється добре відомими методами, вибір яких, як правило, залежить від типу вектора, що використовується. Щодо трансформації прокаріотичних клітин-хазяїв див., наприклад, Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, і Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. Трансформація дріжджових клітин описана в роботі Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. Метод Beggs (1978) Nature 275,104-109 також є корисним. Щодо клітин хребетних, реагенти, придатні для трансфекції таких клітин, наприклад, фосфат кальцію і ДЕАЕ-декстран або ліпосомні препарати, доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, або Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Меріленд 20877, США. Електропорація також придатна для трансформації та/або трансфекції клітин і відома в цій галузі як метод трансформації клітин дріжджів, клітин бактерій, клітин комах і клітин хребетних.

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

Фахівцям у цій галузі очевидно, що деякі клітини-хазяї за винаходом придатні для отримання пептидів за винаходом, наприклад, клітини бактерій, дріжджів і комах. Однак інші клітина-хазяї також можуть використовуватися у певних терапевтичних методах. Наприклад, антигенпрезентуючі клітини, такі як дендритні клітини, можуть успішно використовуватися для експресії пептидів за винаходом, так що ними можуть бути навантажені відповідні молекули МНС. Отже, предметом цього винаходу є клітини-хазяї, що містять нуклеїнові кислоти або вектор експресії за цим винаходом.

У переважному втіленні клітина-хазяїн є антигенпрезентуючою клітиною, зокрема, дендритною клітиною або антигенпрезентуючою клітиною. Зараз проводиться дослідження застосування для лікування раку передміхурової залози АПК, навантажених рекомбінантним

злитим білком, що містить простатичну кислоту фосфатазу (Sipuleucel-T) (Rini і співавт., 67-74; Small і співавт., 3089-94).

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

В іншому втіленні пептид, нуклеїнова кислота або вектор експресії за винаходом застосовуються у медицині. Наприклад, пептид чи його варіант може бути підготовлений для внутрішньовенного (i.v.) введення, підшкірного (s.c.) введення, внутрішньошкірного (i.d.) введення, внутрішньочеревного (i.p.) введення, внутрішньом'язового (i.t.) введення. Переважні способи введення пептиду - це s.c., i.d., i.p., i.m. та i.v. Переважними способами введення ДНК є i.d., i.m., s.c., i.p. та i.v. Можуть вводитись дози від 50 мкг до 1,5 мг, переважно від 125 до 500 мкг пептиду або ДНК залежно від відповідного пептиду чи ДНК. Дози в цьому діапазоні успішно використовувались в попередніх дослідженнях (Brunsvig і співавт., 1553-64; Staehler і співавт.).

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

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

Лінія клітин людини Т2, на які недостатньо завантажуються пептиди, доступна для придбання в American Type Culture Collection за адресою 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США, номер за каталогом CRL 1992; лінія клітин дрозофіли Schneider 2 доступна для придбання в ATCC, номер за каталогом CRL 19863; клітинна лінія миші RMA-S описана у Karre і співавт., 1985.

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

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

Якщо антигенпрезентуючу клітину трансфектують для експресії такого епітопу, клітина переважно містить вектор експресії, здатний експресувати пептид, що містить послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95 або варіант його амінокислотної послідовності.

Ряд інших методів можуть використовуватися для отримання ЦТЛ *in vitro*. Наприклад, метод, описаний Peoples і співавт., (1995) і Kawakami і співавт., (1992) відносно використання аутологічних лімфоцитів, які інфільтрують пухлину, для отримання ЦТЛ. Plebanski і співавт. (1995) використовували аутологічні лімфоцити периферійної крові (PLB) для отримання ЦТЛ. У роботі Jochmus і співавт., (1997) описано створення аутологічних ЦТЛ методом імпульсного введення пептиду або поліпептиду у дендритні клітини або інфікуванням рекомбінантним вірусом. Hill і співавт., (1995) і Jerome і співавт., (1993) використовували В-клітини для отримання аутологічних ЦТЛ. Крім того, для отримання аутологічних ЦТЛ можуть використовуватися макрофаги, завантажені пептидом або поліпептидом, або інфіковані рекомбінантним вірусом. S. Walter і співавт., 2003, описують примування Т-клітин *in vitro* за допомогою штучних антигенпрезентуючих клітин (штучні АПК), що також є прийнятним способом отримання Т-клітин проти вибраного пептиду. В цій роботі штучні АПК генерувалися шляхом прикріплення заздалегідь сформованих комплексів МНС-пептид до поверхні полістирольних частинок (мікросфер) за допомогою системи біотин-стрептавідин. Ця система дозволяє точно контролювати щільність МНС на штучних АПК, що забезпечує селективно викликати високо- або низькоавідні специфічні до антигену відповіді Т-клітин з високою ефективністю для зразків крові. Окрім комплексів МНС-пептид, штучні АПК мають нести інші білки з коstimулювальною активністю, такі як антитіла проти CD28, прикріплені до їхньої поверхні. До того ж такі системи на базі штучних АПК часто вимагають додавання відповідних розчинних елементів, наприклад, цитокінів, таких як інтерлейкін-12.

Алогенні клітини також можуть використовуватися для отримання Т-клітин, і відповідний спосіб описаний детально у заявці WO 97/26328, яка включена в цей документ шляхом

посилання. Наприклад, окрім клітин дріжджі і клітин T2, інші клітини можуть використовуватися для презентації антигенів, такі як клітини CHO, інфіковані бациловірусом клітини комах, бактеріальні, дріжджові клітини та клітини мішені, інфіковані коров'ячою віспою. Крім того, можуть використовуватись віруси рослин (див., наприклад, роботу Porta і співавт., (1994), в якій описується розробка мозаїчного вірусу вігні як високопродуктивної системи для презентації чужорідних пептидів).

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

Активовані Т-клітини, які отримані вищезгаданим способом, будуть селективно розпізнавати клітину, яка абераантно експресує поліпептид, який містить послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 95.

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

*In vivo* клітини-мішені для CD-позитивних Т клітин за цим винаходом можуть бути клітинами пухлини (які іноді експресують MHC I класу) та/або клітинами стромы, що оточують пухлину (пухлинні клітини) (які іноді також експресують MHC I класу; (Dengjel і співавт., 4163-70)).

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

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

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

Протоколи для цього так званого адаптивного перенесення Т-клітин добре відомі в галузі, їх можна знайти, наприклад, у роботах (Dudley і співавт., 850-54; Dudley і співавт., 2346-57; Rosenberg і співавт., 889-97; Rosenberg і співавт., 1676-80; Yee і співавт., 16168-73); в оглядах (Gattinoni і співавт., 383-93) і (Morgan і співавт.).

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

Переважаю, лікарський засіб за цим винаходом є вакциною. Вона може вводиться безпосередньо пацієнту, в уражений орган, або системно i.d., i.m., s.c, i.p. і i.v, чи застосовуватися *ex vivo* до клітин, виділених у пацієнта чи клітинної лінії людини, котрі згодом вводяться пацієнту, або використовуватись *in vitro* для вибору субпопуляції з імунних клітин, які виділяються у пацієнта і потім знов вводяться йому. Якщо нуклеїнова кислота вводиться у клітини *in vitro*, вона може бути корисною для клітин, що трансфектуються, щоби спільно експресувати імуностимулюючі цитокіни, наприклад, інтерлейкін -2. Пептид може бути, по суті, чистим, або поєднаним з імуностимулюючим ад'ювантом (див. нижче), чи використовуватись в комбінації з імуностимулюючими цитокінами, або вводиться з належною системою доставки, наприклад, ліпосомами. Пептид також може поєднуватись з належним носієм, таким як



гемоціанін фісурели (KLH) або маннан (див. патентну заявку WO 95/18145 та роботу Longenecker). Пептид також може бути міченим і бути злитим білком чи гібридною молекулою. Очікується, що пептиди, послідовність яких надається в цьому винаході, стимулюють CD4 Т-клітини або CD8 Т-клітини. Однак стимуляція CD8 ЦТЛ більш ефективна у присутності підтримки, яка надається Т-хелперами CD4. Отже, для епітопів МНС І класу, які стимулюють CD8 ЦТЛ, гібридного партнера або частини гібридної молекули, належним чином надають епітопи, котрі стимулюють CD4-позитивні Т-клітини. CD4- та CD8-стимулюючі епітопи добре відомі в цій галузі та включають епітопи, ідентифіковані в цьому винаході.

Згідно з одним аспектом винаходу, вакцина містить принаймні один пептид, який має амінокислотну послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 33, і принаймні один додатковий пептид, більш переважно, від двох до 25, ще більш переважно, від двох до 15, і найбільш переважно, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять або тринадцять пептидів. Пептид(и) може (можуть) бути виділений (виділені) з одного або більшої кількості специфічних TAA і може (можуть) зв'язатися з молекулами МНС І класу.

Полінуклеотид може бути по суті чистим або міститися у відповідній векторній системі або системі доставки. Нуклеїнова кислота може бути, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, СНК, РНК чи їхньою комбінацією. Методи конструювання і введення такої нуклеїнової кислоти добре відомі фахівцям в цій галузі. Їх огляд наведений, наприклад, у роботі (Pascolo і співавт., 117-22). Полінуклеотидні вакцини легко приготувати, але механізм дії цих векторів у виникненні імунної відповіді повністю не з'ясований. Прийнятні векторні системи і системи доставки включають вірусну ДНК та/або РНК, такі як системи на базі аденовірусу, вірусу коров'ячої віспи, ретровірусу, вірусу герпесу, аденоасоційованого вірусу або гібридів, що містять елементи більш ніж одного вірусу. Невірусні системи доставки включають катіонні ліпіди і катіонні полімери і добре відомі фахівцям в області доставки ДНК. Також може використовуватись фізична доставка, така, як за допомогою "генної гармати". Пептид, або пептид, кодований нуклеїновою кислотою, може бути злитим білком, наприклад, з епітопом, що стимулює Т-клітини щодо відповідних протилежних CDR, як відзначається вище.

Лікарський засіб за винаходом може також включати один або більше ад'ювантів. Ад'юванти є речовинами, які у неспецифічний спосіб підвищують або надають силу імунній відповіді (наприклад, імунній відповіді, яку опосередковують ЦТЛ і Т-хелпери (T<sub>H</sub>) на антиген, і, отже, можуть використовуватися у лікарському засобі за винаходом. Відповідні ад'юванти включають, але не обмежуються ними, 1018 1SS, солі алюмінію, Amplivax®, AS 15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, флагелін чи ліганди TLR5, які походять з флагеліну, флагелін чи ліганди TLR5, які походять з флагеліну, ліганд FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, іміквімод (ALDARA®), резиквімод, ImuFact IMP321, інтерлейкіни, такі як ІЛ-2, ІЛ-13, ІЛ-21, інтерферон-альфа чи -бета, або їхні пегільовані похідні, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, імуностимулюючі комплекси ISCOM, JuvImmune, LipoVac, MALP2 MF59, монофосфориловий ліпід А, монтанід IMS 1312, монтанід ISA 206, монтанід ISA 50V, монтанід ISA-51, емульсії "вода у маслі" та "масло у воді", OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторну систему PepTel®, мікрочастинки на основі полілактиду когліколіду [PLG] та декстрану, талактоферин, SRL172, віросоми та інші вірусоподібні частинки, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон QS21 Aquila, який виділяється з сапоніну, мікобактеріальні екстракти та синтетичні імітатори стінок бактеріальних клітин, а також інші патентовані ад'юванти, наприклад, Ribi's Detox. Quil чи Superfos. Переважними є такі ад'юванти, як ад'ювант Фрейнда або GM-CSF. Декілька імунологічних ад'ювантів (наприклад, MF59), специфічних до дендритних клітин, та способи їх приготування були описані раніше (Allison і Krummel, 932-33). Також можуть застосовуватися цитокіни. Окремі цитокіни були прямо співвіднесені з впливом на міграцію дендритних клітин до лімфоїдних тканин (наприклад, TNF-D), прискорюючи дозрівання дендритних клітин до ефективних антигенпрезентуючих клітин для Т-лімфоцитів (наприклад, GM-CSF, IL-1 та IL-4) (Патент США 5 849 589, окремо включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті) та діючи як імуoad'юванти (наприклад, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-альфа, IFN-бета) [Gabrilovich, 1996].

Також доповідалося про те, що імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди посилюють ефект ад'ювантів у складі вакцин. Якщо не вдаватися у подробиці теорії, CpG олігонуклеотиди діють шляхом активації природної (не здобутої) імунної системи за допомогою Toll-подібних рецепторів (TLR), переважно TLR. Активация TLR9, ініційована CpG, посилює антиген-специфічні гуморальні та клітинні реакції на широкий спектр антигенів, включаючи пептидні чи білкові антигени, живі або знищені віруси, вакцини на основі дендритних клітин, аутологічні клітинні вакцини та полісахаридні кон'югати як в профілактичних, так і в терапевтичних вакцинах. Більш важливим є те, що посилюється визрівання та диференціація дендритних

клітин, що в результаті збільшує активацію Т<sub>H</sub>1-клітин та інтенсивну генерацію цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL) навіть за відсутності допомоги CD4 Т-клітин. Активация Т<sub>H</sub>1, індукована стимуляцією TLR9, зберігається навіть у присутності вакцинних ад'ювантів, таких як солі алюмінію чи неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), котрі зазвичай сприяють активації Т<sub>H</sub>2. CpG-олігонуклеотиди демонструють навіть більшу ад'ювантну активність, коли переводяться в лікарську форму або вводяться разом з іншими ад'ювантами чи в таких композиціях, як мікрочастинки, наночастинки, ліпідні емульсії або подібні композиції, особливо необхідні для індукування сильної реакції, коли антиген відносно слабкий. Вони також прискорюють імунну відповідь та дозволяють зменшити дози антигену приблизно на два порядки в порівнянні з відповідями антитіл на вакцину в повній дозі без CpG, як спостерігалось в деяких експериментах (Krieg 471-84). В патенті США 6 406 705 В1 описується комбіноване використання CpG-олігонуклеотидів, ад'ювантів, що не містять нуклеїнові кислоти, та антигену для індукування антиген-специфічної імунної відповіді. CpG TLR9-aHTaгoHicTOM є dSLIM (імуномодулятор із структурою типу дволанцюжкове стебло-петля) компанії Mologen (Берлін, Німеччина), котрий є переважним компонентом фармацевтичної композиції за цим винаходом. Також можуть використовуватись інші TLR-зв'язувальні молекули, наприклад, TLR 7, TLR 8 та/або TLR 9, що зв'язані з РНК.

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

Переважаючими ад'ювантами є іміквімод, резиквімод, GM-CSF, циклофосфамід, сунітиніб, бевакізумаб, інтерферон-альфа, CpG-олігонуклеотиди та їхні похідні, полі(I:C) та похідні, РНК, сілденафіл і композиції частинок з PLG чи віросомами.

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

У переважному втіленні фармацевтичної композиції за винаходом ад'ювантом є іміквімод чи резиквімод.

Ця композиція може застосовуватися для парентерального введення, наприклад, підшкірного, внутрішньошкірного, внутрішньом'язового або для перорального застосування. Для цього пептиди і необов'язково інші молекули розчиняють або суспендують у фармацевтично прийнятному, переважно водному, носії. До того ж композиція може містити допоміжні речовини, такі як буферні елементи, зв'язувальні речовини, баластні речовини, розріджувачі, ароматизатори, мастильні речовини та ін.

Пептиди також можуть вводиться разом із імуностимулюючими речовинами, наприклад, цитокінами. Вичерпний перелік допоміжних речовин, які можуть використовуватись у такій композиції, наведений, наприклад, в книзі A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. Ed. 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press. Композиція може застосовуватися для попередження, профілактики та/або терапії аденомних чи ракових захворювань. Приклади фармацевтичних композицій наведені в EP2113253.

Предметом цього винаходу є лікарський засіб, який може застосовуватися при лікуванні раку, зокрема, раку шлунка, раку нирок, раку товстої кишки, недрібноклітинного раку легенів, аденокарциноми, раку передміхурової залози, доброякісних пухлин та злоякісної меланоми.

За цим винаходом також пропонується комплект, що включає:

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

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

(с) необов'язково, інструкції з (i) застосування розчину або (ii) відновлення та/або застосування ліофілізованої композиції.

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

Комплекти за винаходом, переважно, включають ліофілізовану композицію цього винаходу в належному контейнері та інструкції по її відновленню та/або застосуванню. Належні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони (наприклад, флакони з двома камерами), шприці (такі як двокамерні шприці) і пробірки. Контейнер може бути виготовлений з різних матеріалів, таких як скло чи пластмаса. Переважно, комплект та/або контейнер містить інструкції на контейнері або такі, що зв'язані з ним, із вказівками щодо відновлення та/або застосування. Наприклад, на етикетці може вказуватися, що ліофілізована лікарська форма повинна бути відновленою до концентрацій пептидів як зазначено вище. На етикетці, крім того, може бути зазначено, що лікарська форма є прийнятною для або що вона призначена для підшкірного введення.

Контейнер, що містить лікарську форму, може бути флаконом багаторазового використання, який дозволяє робити повторні введення (наприклад, від 2 до 6 введень) відновленої лікарської форми. Комплект додатково може включати другий контейнер з прийнятним розріджувачем (наприклад, розчином бікарбонату натрію).

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

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

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

Контейнер терапевтичного комплекту може являти собою флакон, пробірку, колбу, пляшку, шприц або будь-який інший засіб для зберігання твердого тіла чи рідини. Зазвичай, коли є більш ніж один компонент, комплект буде включати другий флакон чи другий контейнер, який дозволяє окреме дозування. Комплект може також містити інший контейнер для фармацевтично прийнятної рідини. Переважно, терапевтичний комплект буде включати апарат (наприклад, одну чи кілька голок, шприців, крапельниць для очей, піпетку та ін.), який робить можливим введення речовин за винаходом, які є компонентами цього комплекту.

Композиція за цим винаходом є прийнятною для введення пептидів будь-яким зручним шляхом, наприклад, пероральним (ентеральним), назальним, очним, підшкірним, внутрішньошкірним, внутрішньом'язовим, внутрішньовенним або трансдермальним. Переважно, введення здійснюється підшкірно, та найбільш переважно, внутрішньошкірно. Введення може виконуватись інфузійним насосом.

Оскільки пептиди за винаходом, які є похідними MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB і MUC6, були виділені з тканин ракових пухлин шлунка, лікарський засіб за винаходом переважно застосовується для лікування раку шлунка.

Цей винахід зараз буде проілюстрований наведеними нижче прикладами, які описують його переважні втілення, але не обмежують винахід. Для цілей цього винаходу всі посилання включені в цей документ в усій повноті.

#### ПРИКЛАДИ

##### ПРИКЛАД 1:

Ідентифікація пухлино-асоційованих пептидів, презентованих на поверхні клітин  
Зразки клітин

Тканини пухлин пацієнтів були надані Медичним університетом префектури Кіото (KPU), Кіото, Японія, клінікою Магістратури з медицини Університету міста Осака (OSU), Осака, Японія,

та Госпіталю Університету міста Тюбінген, Німеччина. До хірургічного видалення тканин була одержана письмова інформована згода від усіх пацієнтів. Тканини були заморожені шокним способом в рідкому азоті відразу після хірургічної операції та зберігались до виділення TUMAP при температурі -80 °C.

5 Виділення пептидів, зв'язаних із HLA, із зразків тканин

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

#### 10 Методи

Одержані пули пептидів HLA розділялися відповідно до їхньої гідрофобності із використанням зворотно-фазової хроматографії (nanoAcquity UPLC system, Waters), та елюювані пептиди були проаналізовані на гібридному мас-спектрометрі LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific) з джерелом ESI. Пептидні пули були завантажені безпосередньо на аналітичну кварцову мікрокапілярну колонку (75 мкм в.д. × 250 мм), заповнену зворотно-фазовим матеріалом C18 розміром 1,7 мкм (Waters), із застосуванням швидкості потоку 400 нл на хвилину. Згодом пептиди були розділені з використанням 180-хвилинного бінарного градієнту з 10 % до 33 % B при швидкості потоку 300 нл на хвилину. Градієнт був забезпечений розчинником A (0,1 % мурашиної кислоти в воді) та розчинником B (0,1 % мурашиної кислоти в ацетонітрілі). Був використаний скляний капіляр із золотим покриттям (PicoTip, New Objective) для введення в нано-ESI джерело. Мас-спектрометр LTQ-Orbitrap працював в режимі, залежному від даних, з використанням стратегії TOP5. Стисло, цикл сканування був ініційований з повним скануванням при високій точності маси на Orbitrap (R = 30 000) з наступними сканами MS/MS також на Orbitrap (R = 7500) на 5 найбільш поширених прекурсорних іонах з динамічним виключенням раніше вибраних іонів. ТанDEMні мас-спектри були інтерпретовані SEQUEST з додатковим контролем в ручному режимі. Ідентифікована пептидна послідовність була підтверджена порівнянням генерованої природної моделі фрагментації пептиду з моделлю фрагментації синтетичного контрольного пептиду з ідентичною послідовністю. На Фігурі 1 показані зразки спектру, одержані на тканині пухлин для пептиду CDC2-001, асоційованого з MHC I класу, та його профіль елюції на системі UPLC.

#### 30 ПРИКЛАД 2

Профілі експресії генів, що кодують пептиди за винаходом

Не всі пептиди, ідентифіковані як такі, що презентуються на поверхні клітин пухлин молекулами MHC, є прийнятними для імунотерапії, оскільки більшість з цих пептидів отримується з нормальних клітинних білків, експресованих багатьма типами клітин. Лише декілька з цих пептидів є пухлино-асоційованими та, ймовірно, здатні індукувати Т-клітини з високою специфічністю розпізнавання для пухлини, з якої вони походять. Щоб ідентифікувати такі пептиди і звести до мінімуму ризик аутоімунності, викликані вакцинацією, автори винаходу зосередились на тих пептидах, що одержані з білків, котрі надмірно експресуються на клітинах пухлин у порівнянні з більшістю нормальних тканин.

Ідеальний пептид одержують з білку, що є унікальним для пухлини і не присутній на будь-якій іншій тканині. Щоб ідентифікувати пептиди, котрі одержуються з генів з профілем експресії, близьким до ідеального, ідентифіковані пептиди співвідносили з білками та генами, відповідно, з яких вони походять, та були побудовані профілі експресії цих генів.

#### 45 Джерела та приготування РНК

Зразки тканин, видалені хірургічним шляхом, були надані різними клінічними установами (див. Приклад 1), після одержання письмової інформованої згоди від кожного пацієнта. Зразки тканини пухлин були миттєво заморожені в рідкому азоті відразу після хірургічної операції та пізніше гомогенізовані з використанням ступки та товкача під рідким азотом. Підсумкова РНК була приготована з цих зразків з використанням реактиву TRI (Ambion, Дармштадт, Німеччина), з наступним очищенням за допомогою RNeasy (QIAGEN, Хільден, Німеччина); обидві методики виконувались за протоколом виробника.

Підсумкова РНК зі здорових тканин людей була одержана комерційним шляхом (Ambion, Хантінгтон, Велика Британія; Clontech, Гейдельберг, Німеччина; Stratagene, Амстердам, Нідерланди; BioChain, Хейард, Каліфорнія, США). РНК від кількох людей (від 2 до 123 людей) були змішані таким чином, щоб РНК від кожної особи була однаково зважена. Лейкоцити були виділені зі зразків крові 4 здорових добровольців.

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

## Експерименти з використанням мікрочипів

Аналіз генної експресії усіх зразків РНК пухлинних і нормальних тканин був виконаний з використанням олігонуклеотидних мікрочипів Affymetrix Human Genome (HG) U133A або HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Санта Клара, Каліфорнія, США). Усі етапи виконувалися відповідно до посібника Affymetrix. Стисло, дволанцюгова кДНК була синтезована з 5-8 мкг підсумкової РНК, з використанням Superscript RTII (Invitrogen) та оліго-(1T-T7-праймеру (MWG Biotech, Еберсберг, Німеччина), як описано в посібнику. Транскрипція *in vitro* була виконана з використанням комплексу маркування РНК-транскриптів BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фармінгдейл, Нью-Йорк, США) для чипів U133A або комплексу GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипів U133 Plus 2.0, після чого були здійснені кРНК-фрагментація, гібридизація та забарвлювання стрептавідин-фікоеритриновим та біотинільованим анти-стрептавідиновим антитілом (Molecular Probes, Лейден, Нідерланди). Зображення були скановані приладом Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) або Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0). Дані аналізувалися за допомогою програми GCOS (Affymetrix), з використанням стандартних установок для усіх параметрів. Для стандартизації були застосовані 100 службових генів, наданих компанією Affymetrix. Відносні значення експресії були розраховані відносно зареєстрованих сигналів, наданим комп'ютерною програмою, причому значення для нормального зразка було довільно встановлене на 1,0.

Профілі експресії вихідних генів цього винаходу, які в значній мірі надмірно експресуються у раковій пухлині шлунка, показані на Фігурі 2.

## ПРИКЛАД 3

Імуногенність *in vitro* для пептидів, презентованих МНС I класу, в IMA941 Для одержання інформації відносно імуногенності TUMAP за цим винаходом дослідження проводилися з використанням добре відомої методики стимуляції *in vitro*, вже описаної в роботі (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). З використанням цієї платформи була показана позитивна імуногенність (тобто, розширення специфічних Т-клітин) для 47 із 54 досліджених TUMAP, рестрикованих за HLA-A\*2402 і для 3 із 3 досліджених TUMAP за винаходом, рестрикованих за HLA-A\*0201, таким чином демонструючи, що ці пептиди є Т-клітинними епітопами, проти яких у людей існують CD8-позитивні прекурсорні Т-клітини. (Таблиця 4).

Примування CD8-позитивних Т-клітин *in vitro*

Для виконання стимуляції *in vitro* штучними антигенпрезентуючими клітинами (аAPC), завантаженими комплексом пептид-МНС (рМНС) та анти-CD28-антитілом, спочатку були виділені CD8 Т-клітини зі свіжих продуктів лейкофезу HLA-A\*24 або з лейкоцитної плівки HLA-A\*2 здорових донорів, одержаних із Банку крові міста Тюбінген.

CD8 Т-клітини, або безпосередньо збагачені, або PBMC (мононуклеари периферичної крові), були спочатку виділені за допомогою середовища градієнтного розділення стандартної щільності (PAA, Кьольбе, Німеччина). Виділені CD8-лімфоцити або PBMC були інкубовані аж до використання в Т-клітинному середовищі (TCM), що складається з RPMI-Glutamax (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина) з додаванням 10 % термо-інактивованої АВ-сироватки людини (PAN-Biotech, Ейденбах, Німеччина), 100 Од/мл пеніциліну /100 мкг/мл стрептоміцину (Cambrex, Кельн, Німеччина), 1 мМ пірувату натрію (CC Pro, Обердорла, Німеччина), 20 мкг/мл гентаміцину (Cambrex). Цитокини у концентраціях 2,5 нг/мл ІЛ-7 (PromoCell, Гейдельберг, Німеччина) та 10 Од/мл ІЛ-2 (Novartis Pharma, Нюрнберг, Німеччина) також додавалися до TCM на цьому етапі культивування. Виділення CD8-позитивних лімфоцитів виконувалося позитивною селекцією з використанням мікросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергш Гладбах, Німеччина).

Приготування мікросфер, покритих рМНС/анти-CD28, Т-клітинні стимуляції та зчитування виконувалися, як описано раніше (Walter і співавт., 4974-78), з невеликими модифікаціями. Стисло, були отримані біотинільовані завантажені пептидом рекомбінантні молекули HLA-A\*2402 і HLA-A\*0201 без трансмембранного домену, що були біотинільовані на карбоксильному кінці важкого ланцюга. Очищений костимуляторний IgG2a миші проти CD28 Ab 9,3 людини (Jung, Ledbetter і Muller-Eberhard 4611-15) був хімічним способом біотинільований з використанням сульфо-N-гідроксисукцинімідобіотину, як рекомендовано виробником (Perbio, Бонн, Німеччина). Використовувані мікросфери представляли собою полістирольні частинки розміром 5,6 мкм із стрептавідиновим покриттям (Bangs Laboratories, Іллінойс, США). рМНС, використаними як позитивний і негативний контроль, були A\*0201/MLA-001 (пептид ELA1G1LTV з модифікованого Melan-A/MART-1) та A\*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI з DDX5), відповідно.

800 000 мікросфер / 200 мкл були розміщені в планшети на 96 лунок в присутності 600 нг біотинільованих анти-CD28 плюс 200 нг релевантного біотин-рМНС (мікросфери високої щільності). Стимуляції були ініційовані в планшетах на 96 лунок шляхом спільного інкубування  $1 \times 10^6$  CD8-позитивних Т-клітин із  $2 \times 10^5$  промитих мікросфер з покриттям у 200 мкл TCM з доданням 5 нг/мл ІЛ-12 (PromoCell) протягом 3-4 днів при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> і 95 % відносної вологості. Половина середовища була потім замінена свіжим TCM з доданням 80 Од/мл ІЛ-2, та інкубування продовжувалося 3-4 дні при 37 °C. Цей цикл стимуляцій був виконаний три рази.

Нарешті, були виконані аналізи мультимерів забарвлюванням клітин за допомогою флуоресцентних мультимерів A\*0201 або A\*2402 (отриманих за описом {Altman, 1996 ALTMAN1996 /id}) і клону SK1 антитіл CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Німеччина) або додатково за допомогою маркера життєздатності Live/dead-Aqua dye (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина), і вимірюванням на чотирьохкольоровому FACSCalibur (BD) або на цитометрі LSRII SORP (BD; вісімнадцять кольорів, обладнаний синім (488 нм), фіолетовим (405 нм), червоним (640 нм) і зеленим (532 нм) світлофільтрами, відповідно. Пептидо-специфічні клітини були розраховані як процент від загальної кількості CD8-позитивних клітин. Оцінка результатів мультимерного аналізу була виконана за допомогою комп'ютерної програми FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Примування in vitro специфічних мультимер-позитивних CD8+ лімфоцитів було визначене належною установкою гейта та порівнянням зі стимуляціями негативних контролів. Імуногенність для даного антигену визначалася, якщо було виявлено, що принаймні одна оцінювана in vitro стимульована лунка одного здорового донора містить специфічні CD8-позитивну Т-клітини після стимуляції in vitro (тобто, коли ця лунка містила хоча б 1 % специфічних мультимер-позитивних серед CD8-позитивних клітин), та процент специфічних мультимер-позитивних клітин був принаймні в 10 разів більше медіанного значення стимуляцій відповідних негативних контролів (стимуляція невідповідними і забарвлювання відповідними мультимерами) і клітини не знаходилися на діагоналі графіка).

Імуногенність in vitro для пептидів IMA941

Для 47 із 54 перевірених пептидів HLA-A\*2402 і для 3 із 3 перевірених пептидів HLA-A\*0201, імуногенність in vitro могла бути продемонстрована генерацією пептидо-специфічних Т-клітинних ліній. Приклад результатів цитометрії після TUMAP-специфічного мультимерного забарвлення для двох пептидів за винаходом показані на Фігурі 3, разом із відповідним негативним контролем. Результати для 54 пептидів A\*2402 і 3 пептидів A\*0201 за винаходом зведені у Таблицю 4.

Таблиця 4:

Імуногенність in vitro пептидів HLA класу I за винаходом.

Результати експериментів по визначенню імуногенності in vitro, проведених immatics, наведені у відсотках донорів із позитивним результатом і лунок серед тих, що піддаються оцінці. Принаймні чотири донори і 48 лунок піддавали оцінці для кожного пептиду.

SEQ ID NO:	Антиген	Донори позитивні/ті, що оцінювалися [%]	Лунки позитивні/ті, що оцінювалися [%]
1	CDC2-001	83	28
2	ASPM-002	67	32
18	MMP3-001	11	1
4	MET-006	67	21
3	UCHL5-001	75	12
7	MST1R-001	50	13
33	K1F2C-001	17	2
9	SMC4-001	73	10
17	EPHA2-005	0	0
5	PROM 1-001	83	26
6	MMP11-001	33	11
8	NFYB-001	50	7
16	ASPM-001	17	3
20	PLK4-001	60	5
14	ABL1-001	83	18
26	ATAD2-001	33	3

SEQ ID NO:	Антиген	Донори позитивні/ті, що оцінювалися [%]	Лунки позитивні/ті, що оцінювалися [%]
21	ATAD2-002	17	1
27	ATAD2-003	0	0
12	AVL9-001	100	31
22	COL12A1-001	0	0
23	COL6A3-001	0	0
24	FANCI-001	17	1
28	HSP90B1-001	50	7
15	MUC6-001	83	22
13	NUF2-001	100	50
19	NUF2-002	50	6
11	PPAP2C-001	83	29

25	RPS11-001	17	3
29	SIAH2-001	50	8
30	SLC6A6-001	17	1
10	UQCRB-001	83	24
31	IQGAP3-001	100	24
32	ERBB3-001	83	
	CCDC88A-001	0	0
	CCNB1-003	33	3
	CCND2-001	17	10
	CCNE2-001	0	0
	CEA-010	40	3
	CLCN3-001	33	6
	DNAJC10-001	50	15
	DNAJC10-002	33	3
	EIF2S3-001	17	1
	E1F3L-001	100	29
	EPPK1-001	17	1
	GPR39-001	50	6
	ITGB4-001	67	20
	LCN2-001	17	1
	SDHC-001	33	3
	PBK-001	0	0
	POLD3-001	67	7
	PSMD14-001	17	1
	PTK2-001	17	4
	TSPAN1-002	17	1
	ZNF598-001	83	17

5 Наведені нижче пептиди вже були описані в інших заявках immatics і введені у вакцини IMA901 (MET-001 і TOP-001), IMA910 (MET-001 і TOP-001) і IMA950 (IGF2BP3-001). Оскільки, наприклад, MET-001 приводить до надзвичайно сприятливих реакцій *in vivo*, ці дані можуть вважатися як свідчення придатності пептидів за винаходом для клінічного застосування

SEQ ID NO:	Антиген	Донори позитивні/ті, що оцінювалися [%]	Лунки позитивні/ті, що оцінювалися [%]
	IGF2BP3-001	50	21
	MET-001	67	42
	TOP-001	40	10

#### Перелік посилань

- 10 Ahmed, A. U., et al. "Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth." J Natl.Cancer Inst. 100.22 (2008): 1606-29.  
Allison, J. P. and M. F. Krummel. "The Yin and Yang of T cell costimulation." Science 270.5238 (1995): 932-33.

Altmeyer, A., et al. "Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96." *Int J Cancer* 69.4 (1996): 340-49.

Appay, V., et al. "Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide." *Eur.J Immunol.* 36.7 (2006): 1805-14.

5 Banerjee, S. K., et al. "Expression of cdc2 and cyclin B1 in *Helicobacter pylori*-associated gastric MALT and MALT lymphoma : relationship to cell death, proliferation, and transformation." *Am J Pathol.* 156.1 (2000): 217-25.

Bartman, A. E., et al. "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps." *Int J Cancer* 80.2 (1999): 210-18.

10 Basu, S., et al. "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." *Int Immunol.* 12.11 (2000): 1539-46.

Bauer, B., S. Bartfeld, and T. F. Meyer. "H. pylori selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA." *Cell Microbiol.* 11.1 (2009): 156-69.

15 Benatti, P., et al. "A balance between NF-Y and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response." *Nucleic Acids Res* 36.5 (2008): 1415-28.

Bertolini, G, et al. "Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment." *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106.38 (2009): 16281-86.

20 Brierie, B. and H. L. Moses. "TGF-beta and cancer." *Cytokine Growth Factor Rev.* 17.1-2 (2006):29-40.

Bitoun, E. and K. E. Davies. "The robotic mouse: unravelling the function of AF4 in the cerebellum." *Cerebellum.* 4.4 (2005): 250-60.

Bolhassani, A. and S. Rafati. "Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development." *Expert.Rev.Vaccines.* 7.8 (2008): 1185-99.

25 Borset, M., et al. "The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies." *Leuk.Lymphoma* 32.3-4 (1999): 249-56.

Bradbury, P. A., et al. "Matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk and prognosis." *Carcinogenesis* 30.5 (2009): 793-98.

30 Brown, C. E., et al. "Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells." *Cancer Research* 69.23 (2009): 8886-93.

Bruckdorfer, T., O. Marder, and F. Albericio. "From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future." *Curr.Pharm.Biotechnol.* 5.1 (2004): 29-43.

35 Brunsvig, P. F., et al. "Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer." *Cancer Immunol.Immunother.* 55.12 (2006): 1553-64. Cabanes, D., et al. "Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein." *EMBO J* 24.15 (2005): 2827-38.

Calzado, M. A., et al. "An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response." *Nat.Cell Biol.* 11.1 (2009): 85-91.

40 Castelli, C, et al. "Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer." *Cancer Immunol.Immunother.* 53.3 (2004): 227-33. Castriconi, R., et al. "Both CD 133+ and C." *Eur.J Immunol.* 37.11 (2007): 3190-96. Chanock, S. J., et al. "HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA." *Hum.Immunol.* 65 (2004): 1211-23.

45 Chen, C. H., et al. "Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3." *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100.16 (2003): 9226-31.

Chen, Z. and J. J. O'Shea. "Regulation of IL-17 production in human lymphocytes." *Cytokine* 41.2 (2008): 71-78.

50 Cho, S. O., et al. "*Helicobacter pylori* in a Korean Isolate Expressed Proteins Differentially in Human Gastric Epithelial Cells." *Dig.Dis.Sci.* (2009).

Christianson, J. C, et al. "OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD." *Nat.Cell Biol.* 10.3 (2008): 272-82. Cisek, L. J. and J. L. Corden. "Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2." *Nature* 339.6227 (1989): 679-84.

55 Colombetti, S., et al. "Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin." *J Immunol.* 176.5 (2006): 2730-38.

Confalonieri, S., et al. "Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor." *Oncogene* 28.33 (2009): 2959-68.



Corso, S., et al. "Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases." *Oncogene* 27.5 (2008): 684-93.

Cox, C. V., et al. "Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL." *Blood* 113.14 (2009): 3287-96.

5 Cunha-Ferreira, I., et al. "The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4." *Curr.Biol.* 19.1 (2009): 43-49.

DeLuca, J. G., et al. "Heel and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites." *Mol.Biol.Cell* 16.2 (2005): 519-31.

10 Deng, H., et al. "Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells." *Biochem.Biophys.Res Commun.* 326.2 (2005): 274-81.

Dengjel, J., et al. "Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas." *Clin Cancer Res.* 12.14 (2006): 4163-70.

Deremer, D. L., C. Ustun, and K. Natarajan. "Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia." *Clin Then* 30.11 (2008): 1956-75.

15 Di Renzo, M. F., et al. "Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer." *Clin.Cancer Res.* 1.2 (1995): 147-54.

Dong, G., et al. "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and P13K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma." *Cancer Res.* 61.15 (2001):5911-18.

20 Dudley, M. E., et al. "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* 298.5594 (2002): 850-54.

Dudley, M. E., et al. "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." *J.Clin.Oncol.* 23.10 (2005): 2346-57.

Duong, C., et al. "Pretreatment gene expression profiles can be used to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal cancer." *Ann Sun; Oncol* 14.12 (2007): 3602-09.

Egland, K. A., et al. "High expression of a cytokeratin-associated protein in many cancers." *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103.15 (2006): 5929-34.

30 Eramo, A., et al. "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." *Cell Death Differ* 15.3 (2008): 504-14.

Esashi, F., et al. "CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair." *Nature* 434.7033 (2005): 598-604.

35 Escobar, M. A., et al. "Profiling of nuclear extract proteins from human neuroblastoma cell lines:the search for fingerprints." *J Pediatr.Surg* 40.2 (2005): 349-58.

Ferracini, R., et al. "The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit." *Oncogene* 10.4 (1995): 739-49.

Fischer, J., et al. "Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours." *Oncogene* 17.6 (1998): 733-39.

40 Flanagan, J. M., et al. "Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets." *Mol .Cancer Ther.* 8.1 (2009): 249-60.

Fong, L., et al. "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98.15 (2001): 8809-14.

45 Frasor, J., et al. "Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes." *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102.37(2005): 13153-57.

Frew, I. J., et al. "Generation and analysis of Siah2 mutant mice." *Mol.Cell Biol.* 23.24 (2003):9150-61.

50 Fu, Y. and A. S. Lee. "Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy." *Cancer Biol.Ther.* 5.7 (2006): 741-44.

Furge, K. A., et al. "Suppression of Ras-mediated turn ori gen i city and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98.19 (2001): 10722-27.

Furge, K. A., Y. W. Zhang, and G. F. Vande Woude. "Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins." *Oncogene* 19.49 (2000): 5582-89.

55 Gattinoni, L., et al. "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." *Nat.Rev.Immunol.* 6.5 (2006): 383-93.

Gherardi, E. and M. Stoker. "Hepatocyte growth factor—scatter factor: mitogen, motogen, and met." *Cancer Cells* 3.6 (1991): 227-32.

60 Glen, A., et al. "iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression." *J Proteome.Res* 7.3 (2008): 897-907.

Gnjatic, S., et al. "NY-CO-58/K1F2C is overexpressed in a variety of solid tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer." *Int J Cancer* (2009).

Guo, W. C., et al. "Expression and its clinical significance of heat shock protein gp96 in human osteosarcoma." *Neoplasma* 57.1 (2010): 62-67'.

5 Habelhah, H., et al. "Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2." *EMBO J* 21.21 (2002): 5756-65.

Hamamoto, A., et al. "Aberrant expression of the gastric mucin MUC6 in human pulmonary adenocarcinoma xenografts." *Int J Oncol* 26.4 (2005): 891-96.

10 Harada, T., et al. "Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques." *Pancreatology*. 9.1-2 (2009): 13-24.

Harper, L. J., et al. "Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma." *J Oral Pathol.Med* 36.10 (2007): 594-603.

Hayama, S., et al. "Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis." *Cancer Research* 66.21 (2006): 10339-48.

15 Hayashi, M., et al. "High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer." *Clinical Cancer Research* 14.23 (2008): 7843-49.

Heike, M., et al. "Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer." *Int J Cancer* 86.4 (2000): 489-93.

20 Hodorova, I., et al. "Gp96 and its different expression in breast carcinomas." *Neoplasma* 55.1 (2008): 31-35.

Horton, R. A., et al. "A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein." *Anal.Biochem.* 360.1 (2007): 138-43.

25 House, C. M., A. Moller, and D. D. Bowtell. "Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways." *Cancer Research* 69.23 (2009): 8835-38.

Howard, E. W., et al. "Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer." *Clin Exp.Metastasis* 25.5 (2008): 497-508.

30 Hu, G. and E. R. Fearon. "Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins." *Mol.Cell Biol.* 19.1 (1999): 724-32.

Huang, Y., et al. "Characterization of GPR56 protein and its suppressed expression in human pancreatic cancer cells." *Mol.Cell Biochem.* 308.1 -2 (2008): 133-39.

35 Jansen, M. P., et al. "Downregulation of SIAH2, an ubiquitin E3 ligase, is associated with resistance to endocrine therapy in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat.* 116.2 (2009): 263-71.

Jia, H. L., et al. "Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma." *Clinical Cancer Research* 13.4 (2007): 1133-39.

Jucker, M., et al. "The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma." *Leuk.Res.* 18.1 (1994): 7-16.

40 Jung, G., J. A. Ledbetter, and H. J. Muller-Eberhard. "Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84.13 (1987): 4611-15.

Jung, H. M., S. J. Choi, and J. K. Kim. "Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers." *J Cell Biochem.* 106.4 (2009): 703-13.

45 Kaneko, N., et al. "siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis." *Biochem.Biophys.Res Commun.* 390.4 (2009): 1235-40.

Kang, H. M., et al. "Effects of Helicobacter pylori Infection on gastric mucin expression." *J Clin Gastroenterol.* 42.1 (2008): 29-35.

50 Ko, M. A., et al. "Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis." *Nat.Genet.* 37.8 (2005): 883-88.

Kobayashi, ML, et al. "Activation of ErbB3-PI3-kinase pathway is correlated with malignant phenotypes of adenocarcinomas." *Oncogene* 22.9 (2003): 1294-301.

55 Koochekpour, S., et al. "Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas." *Cancer Res.* 57.23 (1997): 5391-98.

Korzeniewski, N., et al. "Cullin 1 functions as a centrosomal suppressor of centriole multiplication by regulating polo-like kinase 4 protein levels." *Cancer Research* 69.16 (2009):6668-75.

Krieg, A. M. "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." *Nat.Rev.Drug Discov.* 5.6 (2006): 471-84.

- Kunimoto, K., et al. "Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development." *J Cell Physiol* 220.3 (2009): 621-31.
- Kuriyama, R., et al. "Gamma-tubulin-containing abnormal centrioles are induced by insufficient Plk4 in human HCT116 colorectal cancer cells." *J Cell Sci.* 122.Pt 12 (2009): 2014-23.
- Lee, H. S., et al. "MUC1, MUC2, MUC5AC, and MLJC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as prognostic indicators." *Cancer* 92.6 (2001): 1427-34.
- Leivo, I., et al. "Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation." *Cancer Genet.Cytogenet.* 156.2 (2005): 104-13.
- Lemmel, C, et al. "Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling." *Nat.Biotechnol.* 22.4 (2004): 450-54.
- Li, G, et al. "Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development." *Oncogene* 20.56 (2001): 8125-35.
- Lim, S. O., et al. "Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules." *World J Gastroenterol.* 11.14 (2005): 2072-79.
- Lin, W., et al. "Tyrosine kinases and gastric cancer." *Oncogene* 19.49 (2000): 5680-89.
- Liu, B. and Z. LI. "Endoplasmic reticulum HSP90 $\alpha$ 1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin." *Blood* 112.4 (2008): 1223-30.
- Liu, S. Y., et al. "Requirement of MMP-3 in anchorage-independent growth of oral squamous cell carcinomas." *J Oral Pathol.Med* 36.7 (2007): 430-35.
- Lochter, A., et al. "The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression." *Ann N.Y.Acad.Sci.* 857 (1998): 180-93.
- Lund, C. V., et al. "Zinc finger transcription factors designed for bispecific coregulation of ErbB2 and ErbB3 receptors: insights into ErbB receptor biology." *Mol.Cell Biol.* 25.20 (2005):9082-91.
- Ma, S., et al. "Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells." *Gastroenterology* 132.7 (2007): 2542-56.
- MacLeod, R. J., M. Hayes, and I. Pacheco. "Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells." *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 293.1 (2007): G403-G411.
- Macmillan, J. C, et al. "Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer." *Ann Sure Oncol* 8.9 (2001): 729-40.
- Maney, T., et al. "The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view." *Int Rev.Cytol.* 194 (2000): 67-131.
- Martin, C. M., et al. "Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy." *Methods Mol.Biol.* 511 (2009): 333-59.
- Matsukita, S., et al. "Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma." *Histopathology* 42.1 (2003): 26-36.
- Maulik, G, et al. "Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition." *Cytokine Growth Factor Rev.* 13.1 (2002): 41-59.
- Mizrak, D., M. Brittan, and M. Alison. "CD133: molecule of the moment." *J Pathol.* 214.1 (2008): 3-9.
- Montesano, R., et al. "Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis." *Cell Growth Differ.* 9.5 (1998): 355-65.
- Monzani, E., et al. "Melanoma contains CD 133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential." *Eur.J Cancer* 43.5 (2007): 935-46.
- Moore, A. and L. Wordeman. "The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis." *Trends Cell Biol.* 14.10 (2004): 537-46.
- Morgan, R. A., et al. "Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes." *Science* (2006).
- Mori, M., et al. "HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry." *Transplantation* 64.7 (1997): 1017-27.
- Murray, G. I., et al. "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer." *Gut* 43.6 (1998): 791-97.
- Murshid, A., J. Gong, and S. K. Calderwood. "Heat-shock proteins in cancer vaccines: agents of antigen cross-presentation." *Expert.Rev.Vaccines.* 7.7 (2008): 1019-30.
- Nakaigawa, N., et al. "Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma." *Cancer Res.* 66.7 (2006): 3699-705.
- Nakamura, Y., et al. "Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer." *Br.J Cancer* 97.4 (2007): 543-49.

Nakayama, K., J. Qi, and Z. Ronai. "The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response." *Mol. Cancer Res* 7.4 (2009): 443-51.

Naldini, L., et al. "Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET." *Oncogene* 6.4 (1991): 501-04. Nguyen, Q. N., et al. "Light controllable siRNAs regulate gene suppression and phenotypes in cells." *Biochim.Biophys.Acta* 1758.3 (2006): 394-403.

Nishio, K., et al. "Crystal structure of the de-ubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain." *Biochem.Biophys.Res Commun.* 390.3 (2009): 855-60.

Nojima, H., et al. "1QGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK. signalling cascade." *Nat.Cell Biol.* 10.8 (2008): 971-78.

Nomura, H., et al. "Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas." *Int J Cancer* 69.1 (1996): 9-16. Nomura, H., et al. "Network-based analysis of calcium-binding protein genes identifies Grp94 as a target in human oral carcinogenesis." *Br.J Cancer* 97.6 (2007): 792-801.

Ohnuma, S., et al. "Cancer-associated splicing variants of the CDCA1 and MSMB genes expressed in cancer cell lines and surgically resected gastric cancer tissues." *Surgery* 145.1 (2009): 57-68.

Park, Y. H., et al. "Capecitabine in combination with Oxaliplatin (XELOX) as a first-line therapy for advanced gastric cancer." *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2007).

Pascolo, S., et al. "The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells." *Int.Immunol.* 17.2(2005): 117-22.

Peel, N., et al. "Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation." *Curr.Biol.* 17.10 (2007): 834-43.

Pereira, M. B., et al. "Immunohistochemical study of the expression of MUC5AC and MUC6 in breast carcinomas and adjacent breast tissues." *J Clin Pathol.* 54.3 (2001): 210-13. Pietra, G, et al. "Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells." *Int Immunol.* 21.7 (2009): 793-801.

Poller, D. N., et al. "Production and characterization of a polyclonal antibody to the c-erbB-3 protein: examination of c-erbB-3 protein expression in adenocarcinomas." *J Pathol.* 168.3 (1992): 275-80.

Pons, E., C. C. Uphoff, and H. G. Drexler. "Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines." *Leuk.Res.* 22.9 (1998): 797-804. Ponzetto, C, et al. "A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor." *Mol.Cell Biol.* 13.8 (1993): 4600-08.

Poppe, M., et al. "Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility." *Oncogene* 26.24 (2007): 3462-72.

Pytel, D., et al. "Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy." *Anticancer Agents Med Chem.* 9.1 (2009): 66-76.

Qi, J., et al. "The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways." *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105.43 (2008): 16713-18. Qian, C. N., et al. "Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res.* 62.2 (2002): 589-96.

Qian, Z., et al. "Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia." *Chem.Biol.Interact.* (2009).

Ramirez, R., et al. "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)* 53.5 (2000): 635-44.

Rammensee, H. G, et al. "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." *Immunogenetics* 50.3-4 (1999): 213-19.

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

Rappa, G, O. Fodstad, and A. Lorico. "The stem cell-associated antigen CD 133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma." *Stem Cells* 26.12 (2008): 3008-17. Richardson, G. D., et al. "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." *J CellSci.* 117.Pt 16 (2004): 3539-45.

Rini, B. I., et al. "Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy." *Cancer* 107.1 (2006): 67-74.

Rodrigues-Martins, A., et al. "Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis." *Science* 316.5827 (2007): 1046-50.

Rosenberg, S. A., et al. "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." *N.Engl.J.Med.* 316.15 (1987): 889-97.

Rosenberg, S. A., et al. "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." *N.Engl.J Med* 319.25(1988): 1676-80.

Rott, R., et al. "Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells." *J Biol.Chem.* 283.6 (2008): 3316-28. Rutella, S., et al. "Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors." *Clinical Cancer Research* 15.13 (2009): 4299-311. Saiki, R. K., et al. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239.4839 (1988): 487-91.

Samant, G. V. and P. W. Sylvester. "gamma-Tocotrienol inhibits ErbB3-dependent P13K/Akt mitogenic signalling in neoplastic mammary epithelial cells." *Cell Prolif.* 39.6 (2006): 563-74. Sanidas, E. E., et al. "Expression of the c-erbB-3 gene product in gastric cancer." *Int J Cancer* 54.6 (1993): 935-40.

Scott, G K., et al. "Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b." *J Biol.Chem.* 282.2 (2007): 1479-86. Sergina, N. V., et al. "Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactiveHER3." *Nature* 445.7126 (2007): 437-41.

Shah, M., et al. "Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis." *Pigment Cell Melanoma Res* 22.6 (2009): 799-808.

Shapiro, G. I. "Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment." *J Clin Oncol* 24.11 (2006): 1770-83.

Sherman-Baust, C. A., et al. "Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells." *Cancer Cell* 3.4 (2003): 377-86.

Sheu, M. L., S. H. Liu, and K. H. Lan. "Honokiol induces calpain-mediated glucose-regulated protein-94 cleavage and apoptosis in human gastric cancer cells and reduces tumor growth." *PLoS.ONE.* 2.10 (2007): e1096.

Shimo, A., et al. "Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis." *Cancer Sci.* 99.1 (2008): 62-70.

Singh, S. K., et al. "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res.* 63.18 (2003): 5821-28.

Singh, S. K., et al. "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* 432.7015 (2004): 396-401.

Sithanandam, G. and L. M. Anderson. "The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy." *Cancer Gene Ther.* 15.7 (2008): 413-48.

Sithanandam, G, et al. "Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549." *Oncogene* 24.11 (2005): 1847-59.

Skawran, B., et al. "Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma: upregulation of genes in amplified chromosome regions." *Mod.Pathol.* 21.5 (2008): 505-16.

Slesak, B., et al. "Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis." *Anticancer Res* 18.4A (1998): 2727-32.

Small, E. J., et al. "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." *J Clin Oncol.* 24.19 (2006): 3089-94.

Smith, L. M., et al. "CD133/prominin-I is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers." *Br.J Cancer* 99.1 (2008): 100-09.

Smith, M. J., et al. "Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification." *Br.J Cancer* 100.9 (2009): 1452-64.

Smogorzewska, A., et al. "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair." *Cell* 129.2 (2007): 289-301.

Staehler, M., Stenzl, A., Dietrich, P. Y., Eisen, T., Haferkamp, A., Beck, J., Mayer, A., Walter, S., Singh-Jasuja, H., and Stief, C. A phase 1 study to evaluate safety, immunogenicity and anti-tumor activity of the multi-peptide vaccine 1MA901 in renal cell carcinoma patients (RCC). *Journal of Clinical*

Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 25, NO: 18S (June 20 Supplement), 2007: 5098. 6-20-2007.

Ref Type: Abstract Stemmann, O., et al. "Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase." *Cell* 107.6

5 (2001): 715-26.

Suetsugu, A., et al. "Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 351.4 (2006): 820-24.

Suva, M. L., et al. "Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma." *Cancer Research* (2009).

10 Swallow, C J., et al. "Sak/Plk4 and mitotic fidelity." *Oncogene* 24.2 (2005): 306-12.

Szczepanowski, M., et al. "Regulation of repp86 stability by human Siah2." *Biochem.Biophys.Res Commun.* 362.2 (2007): 485-90.

Tajima, Y., et al. "Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significance and genetic background." *Clinical Cancer Research* 12.21 (2006): 6469-79.

15 Takaishi, S., et al. "Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44." *Stem Cells* 27.5 (2009): 1006-20.

Takayama, H., et al. "Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94.2 (1997):701-06.

20 Teofili, L., et al. "Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease." *Blood* 97.4 (2001): 1063-69.

Thorsen, K., et al. "Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis." *Mol.Cell Proteomics.* 7.7 (2008): 1214-24.

25 Tirino, V., et al. "The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer." *Eur.J Cardiothorac.Surg* 36.3 (2009): 446-53.

Todaro, M., et al. "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4." *Cell Stem Cell* 1.4 (2007): 389-402.

30 Topol, L., et al. "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." *J Cell Biol.* 162.5 (2003): 899-908.

Toribara, N. W., et al. "Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning." *J Biol.Chem.* 268.8 (1993): 5879-85.

Tsan, M. F. and B. Gao. "Heat shock protein and innate immunity." *Cell Mol.Immunol.* 1.4 (2004): 274-79.

35 Tuck, A. B., et al. "Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma." *Am.J.Pathol.* 148.1 (1996): 225-32.

Vairaktaris, E., et al. "Association of-1171 promoter polymorphism of matrix metal loproteinase-3 with increased risk for oral cancer." *Anticancer Res* 27.6B (2007): 4095-100.

40 Vandenbroeck, K., E. Martens, and I. Alloza. "Multi-chaperone complexes regulate the folding of interferon-gamma in the endoplasmic reticulum." *Cytokine* 33.5 (2006): 264-73.

Walter, S., et al. "Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres." *J.Immunol.* 171.10 (2003): 4974-78.

Wang, Q., et al. "Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance." *Cancer Detect.Prev.* 29.6 (2005): 544-51.

45 Wang, R., et al. "Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice." *J.Cell Biol.* 153.5 (2001): 1023-34.

Wang, R. Q. and D. C Fang. "Effects of *Helicobacter pylori* infection on mucin expression in gastric carcinoma and pericancerous tissues." *J Gastroenterol.Hepatol.* 21.2 (2006): 425-31.

50 Wang, S., et al. "IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth." *J Cell Sci.* 120.Pt 4 (2007): 567-77.

Wang, X., et al. "Immunolocalisation of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in colonic adenocarcinoma." *Acta Histochem.* 110.2 (2008): 117-23.

Wang, X. P., et al. "Expression and significance of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human esophageal carcinoma." *World J Gastroenterol.* 11.3 (2005): 429-32.

55 Wang, X. P., et al. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma." *World J Gastroenterol.* 11.7(2005): 1056-59.

60 Wang, X. P., Q. X. Wang, and X. P. Ying. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human gastric adenocarcinoma." *Tohoku J Exp.Med* 212.1 (2007): 35-41.

Weinschenk, T., et al. "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines." *Cancer Res.* 62.20 (2002): 5818-27.

White, C. D., M. D. Brown, and D. B. Sacks. "IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis." *FEBS Lett.* 583.12 (2009): 1817-24.

5 Wicks, S. J., et al. "Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway." *Biochem.Soc Trans.* 34.Pt 5 (2006): 761-63.

Wicks, S. J., et al. "The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling." *Oncogene* 24.54 (2005): 8080-84.

10 Yajima, S., et al. "Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer." *Int J Oncol* 31.5 (2007): 1029-37.

Yang, L., et al. "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." *Nature* (2008).

Yang, S., et al. "Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer." *Biochim.Biophys.Acta* 1772.9(2007): 1033-40.

15 Yao, D. F., et al. "Abnormal expression of HSP gp96 associated with HBV replication in human hepatocellular carcinoma." *Hepatobiliarv.Pancreat.Dis.Int* 5.3 (2006): 381-86. Yasui, W., et al. "Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas." *Int J Cancer* 53.1 (1993): 36-41.

20 Yee, C, et al. "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99.25 (2002): 16168-73. Yin, S., et al. "CD 133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity." *Int.J Cancer* 120.7 (2007): 1444-50.

25 Yokozaki, H., W. Yasui, and E. Tahara. "Genetic and epigenetic changes in stomach cancer." *Int Rev.Cytol.* 204 (2001): 49-95.

Yuan, W., et al. "Expression of EphA2 and E-cadherin in gastric cancer: correlated with tumor progression and lymphogenous metastasis." *Pathol.Oncol Res* 15.3 (2009): 473-78. Yuan, W. J., et al. "Over-expression of EphA2 and EphrinA-1 in human gastric adenocarcinoma and its prognostic value for postoperative patients." *Dig.Dis.Sci.* 54.11 (2009): 2410-17. Zaremba, S., et al. "Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen." *Cancer Res.* 57.20 (1997): 4570-77.

Zhang, X., R. M. Kedl, and J. Xiang. "CD40 ligation converts TGF-beta-secreting tolerogenic CD4-8- dendritic cells into IL-12-secreting immunogenic ones." *Biochem.Biophys.Res Commun.* 379.4 (2009): 954-58.

35 Zhang, X. L., et al. "Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer." *World J Sum* 33.10 (2009): 2112-18.

Zhao, C, et al. "Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia." *Nature* (2009).

40 Zheng, H., et al. "Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity." *J Immunol.* 167.12 (2001): 6731-35.

Zheng, H., et al. "MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays." *J Cancer Res Clin Oncol* 132.12 (2006): 817-23.

45 Zheng, H. C, et al. "Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas." *Hum.Pathol.* 39.7 (2008): 1042-49.

Zhou, G, et al. "2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers." *Mol.Cell Proteomics.* 1.2 (2002): 117-24.

Zhou, L., et al. "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function." *Nature* 453.7192 (2008): 236-40.

50 Zhu, K. J., et al. "Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells." *Int Immunopharmacol.* 9.4 (2009): 412-17.

#### ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ.

<110> immatics biotechnologies GmbH

55 <120> ПЕПТИД, НУКЛЕІНОВА КИСЛОТА, ВЕКТОР ЕКСПРЕСІЇ, КЛІТИНА-ХАЗЯЇН ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ ЯК ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПЕПТИДУ,

АКТИВОВАНІ ЦИТОТОКСИЧНІ Т-ЛІМФОЦИТИ ТА СПОСІБ ЇХ ОТРИМАННЯ, СПОСІБ ЗНИЩЕННЯ КЛІТИН-МІШЕНЕЙ В ОРГАНІЗМІ ПАЦІЄНТА

60 <130> I31890PCT

<150> GB1004551.6  
 <151> 2010-03-19

5 <150> US 61/315,704  
 <151> 2010-03-19

<160> 95

10 <170> Patentin version 3.5

<210> 1  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe  
 1 5 10

20 <210> 2  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 2

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile  
 1 5

30 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 3

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu  
 1 5

40 <210> 4  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

45 Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe  
 1 5

50 <210> 5  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 5



Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu Asn Leu  
1 5

5 <210> 6  
<211> 10  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

15 <210> 7  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 7

20 Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe  
1 5

25 <210> 8  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 8

30 Val Tyr Thr Thr Ser Tyr Gln Gln Ile  
1 5

35 <210> 9  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 9

His Tyr Lys Pro Thr Pro Leu Tyr Phe  
1 5

40 <210> 10  
<211> 10  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Tyr Asn Ala Ala Gly Phe Asn Lys Leu  
1 5 10

<210> 11

<211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 11  
 Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu  
 1 5  
 10 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 12  
 Phe Tyr Ile Ser Pro Val Asn Lys Leu  
 1 5  
 20 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe  
 1 5  
 25 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 14  
 Thr Tyr Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu  
 1 5  
 35 <210> 15  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 15  
 Asn Tyr Glu Glu Thr Phe Pro His Ile  
 1 5  
 45 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 50 <400> 16

Arg Tyr Leu Trp Ala Thr Val Thr Ile  
1 5

5  
<210> 17  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Tyr Phe Ser Lys Ser Glu Gln Leu  
1 5

10  
<210> 18  
<211> 9  
<212> Білок  
15 <213> Homo sapiens

<400> 18

Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe  
1 5

20  
<210> 19  
<211> 9  
<212> Білок  
25 <213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe  
1 5

30  
<210> 20  
<211> 9  
<212> Білок  
35 <213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu  
1 5

40  
<210> 21  
<211> 9  
<212> Білок  
45 <213> Homo sapiens

<400> 21

Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu  
1 5

<210> 22  
<211> 9

<213> Homo sapiens

5

Val Tyr Asn Pro Thr Pro Asn Ser Leu  
1 5

10

<213> Homo sapiens

15

Ser Tyr Leu Gln Ala Ala Asn Ala Leu

20

<213> Homo sapiens

25

<213> Homo sapiens

35

<213> Homo sapiens

45

<213> Homo sapiens

50

Leu Tyr Pro Glu Val Phe Glu Lys Phe  
1 5

<210> 28  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 28  
  
 Lys Tyr Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe  
 1 5 10  
  
 10  
 <210> 29  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
  
 15  
 <400> 29  
  
 Val Phe Asp Thr Ala Ile Ala His Leu Phe  
 1 5 10  
  
 20  
 <210> 30  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
  
 25  
 <400> 30  
  
 Val Tyr Pro Asn Trp Ala Ile Gly Leu  
 1 5  
  
 30  
 <210> 31  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 31  
 35  
 Val Tyr Lys Val Val Gly Asn Leu Leu  
 1 5  
  
 40  
 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 32  
  
 Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu  
 1 5  
 45  
  
 <210> 33  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 50  
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Ile Tyr Asn Gly Lys Leu Phe Asp Leu Leu  
1 5 10

5 <210> 34

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

10 <400> 34

Gln Tyr Ile Asp Lys Leu Asn Glu Leu  
1 5

15 <210> 35

<211> 11

<212> Білок

<213> Homo sapiens

20 <400> 35

Met Tyr Met Thr Val Ser Ile Ile Asp Arg Phe  
1 5 10

25 <210> 36

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 36

30 Arg Tyr Leu Pro Gln Cys Ser Tyr Phe  
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> Білок

35 <213> Homo sapiens

<400> 37

Ile Tyr Ala Pro Lys Leu Gln Glu Phe  
1 5

40

<210> 38

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

45

<400> 38

Ile Tyr Pro Asp Ala Ser Leu Leu Ile  
1 5

<210> 39  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 39  
  
 Val Tyr Leu Leu Asn Ser Thr Thr Leu  
 1 5  
 10  
 <210> 40  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 15 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 40  
  
 Ile Tyr Leu Glu Val Ile His Asn Leu  
 1 5  
 20  
 <210> 41  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 41  
  
 Ala Tyr Pro Thr Val Lys Phe Tyr Phe  
 1 5  
 30  
 <210> 42  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 42  
 35  
 Ile Phe Ser Lys Ile Val Ser Leu Phe  
 1 5  
 40  
 <210> 43  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 43  
  
 Tyr Tyr Tyr Val Gly Phe Ala Tyr Leu  
 1 5  
 45  
 <210> 44  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 50 <213> Homo sapiens

<400> 44

Arg Tyr Leu Glu Gly Thr Ser Cys Ile  
1 5

5 <210> 45  
<211> 11  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

10 <400> 45

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe  
1 5 10

15 <210> 46  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

20 <400> 46

Ser Tyr Ala Thr Leu Leu His Val Leu  
1 5

25 <210> 47  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 47

Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Gly Lys Phe  
1 5

30 <210> 48  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Tyr Asn Val Thr Ser Val Leu Phe  
1 5

40 <210> 49  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

45 <400> 49

Ser Tyr Leu Glu Leu Val Lys Ser Leu  
1 5



<210> 50  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 50  
  
 Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe  
 1 5  
 10  
 <210> 51  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 51  
  
 Leu Tyr Leu Glu Asn Ile Asp Glu Phe  
 1 5  
 20  
 <210> 52  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 52  
  
 Val Tyr Ile Ser Ser Leu Ala Leu Leu  
 1 5  
 30  
 <210> 53  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 53  
  
 Arg Tyr Leu Pro Lys Gly Phe Leu Asn Gln Phe  
 1 5 10  
 35  
 <210> 54  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 54  
  
 Tyr Tyr Lys Asn Ile Gly Leu Gly Phe  
 1 5  
 45  
 <210> 55  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 50  
 <400> 55

Val Tyr Thr Thr Met Ala Glu His Phe  
1 5

<210> 56

<211> 9

5 <212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Tyr Ala Tyr Leu Arg Glu His Phe  
1 5

10

<210> 57

<211> 10

<212> Білок

15 <213> Homo sapiens

<400> 57

Leu Tyr Ile Gln Thr Asp His Leu Phe Phe  
1 5 10

20

<210> 58

<211> 10

<212> Білок

<213> Homo sapiens

25

<400> 58

Thr Tyr Lys Tyr Val Asp Ile Asn Thr Phe  
1 5 10

30

<210> 59

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

35

<400> 59

Tyr Phe Ile Ser His Val Leu Ala Phe  
1 5

40

<210> 60

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 60

45

Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu  
1 5

50

<210> 61

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 61

Val Tyr Lys Glu Thr Cys Ile Ser Phe  
1 5

5

<210> 62

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

10

<400> 62

Ala Leu Tyr Asp Ser Val Ile Leu Leu  
1 5

15

<210> 63

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

20

<400> 63

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val  
1 5

25

<210> 64

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 64

30

Leu Ala Asp Glu Thr Leu Leu Lys Val  
1 5

<210> 65

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

35

<400> 65

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val  
1 5

40

<210> 66

<211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

45

<400> 66

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu  
1 5

<210> 67  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 67  
  
 Val Leu Glu Asp Leu Glu Val Thr Val  
 1 5  
 10  
 <210> 68  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 15 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 68  
  
 Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val  
 1 5  
 20  
 <210> 69  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 69  
  
 Asn Leu Leu Asp Leu Asp Tyr Glu Leu  
 1 5  
 30  
 <210> 70  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 70  
 35  
 Phe Leu Ile Asp Ser Ser Glu Gly Val  
 1 5  
  
 <210> 71  
 <211> 9  
 40 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 71  
  
 Ala Leu Asp Glu Gly Asp Ile Ala Leu  
 1 5  
 45  
  
 <210> 72  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 50 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 72

Ala Leu Asn Glu Glu Ala Gly Arg Leu Leu Leu  
1 5 10

<210> 73  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 73

Ile Leu Ser Pro Thr Val Val Ser Ile  
1 5

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

<400> 74

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala  
1 5

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

<400> 75

Ala Leu Val Gln Asp Leu Ala Lys Ala  
1 5

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

<400> 76

Ile Leu Gln Asp Arg Leu Asn Gln Val  
1 5

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

<400> 77

Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu  
1 5

<210> 78  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 78  
 Thr Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Ile  
 1 5  
 10  
 <210> 79  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 79  
 Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu  
 1 5 10  
 20  
 <210> 80  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 80  
 Ser Leu Ala Glu Val Asn Thr Gln Leu  
 1 5  
 30  
 <210> 81  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 81  
 Ala Leu Asp Gly Phe Val Met Val Leu  
 1 5  
 35  
 <210> 82  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 82  
 Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu  
 1 5  
 45  
 <210> 83  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 50  
 <400> 83

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile  
1 5

5  
<210> 84  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 84

10  
Tyr Leu Leu Ser Tyr Ile Gln Ser Ile  
1 5

15  
<210> 85  
<211> 9  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens

<400> 85

Gln Ile Asp Asp Val Thr Ile Lys Ile  
1 5

20  
<210> 86  
<211> 10  
<212> Білок  
25 <213> Homo sapiens

<400> 86

Tyr Leu Tyr Gly Gln Thr Thr Thr Tyr Leu  
1 5 10

30  
<210> 87  
<211> 9  
<212> Білок  
35 <213> Homo sapiens

<400> 87

Lys Leu Asp Glu Thr Gly Asn Ser Leu  
1 5

40  
<210> 88  
<211> 9  
<212> Білок  
45 <213> Homo sapiens

<400> 88

Arg Leu Asp Asp Leu Lys Met Thr Val  
1 5

<210> 89

<211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 89  
 Leu Thr Asp Glu Ile Leu Thr Tyr Val  
 1 5  
 <210> 90  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 90  
 15 Ile Leu Ile Asp Trp Leu Val Gln Val  
 1 5  
 <210> 91  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 91  
 25 Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile  
 <210> 92  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 92  
 Ser Ile Phe Gly Glu Asp Ala Leu Ala Asn Val  
 1 5 10  
 35 <210> 93  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 93  
 Lys Leu Leu Glu Tyr Ile Glu Glu Ile  
 1 5  
 45 <210> 94  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 50 <400> 94



Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val  
1 5

5  
<210> 95  
<211> 10  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 95

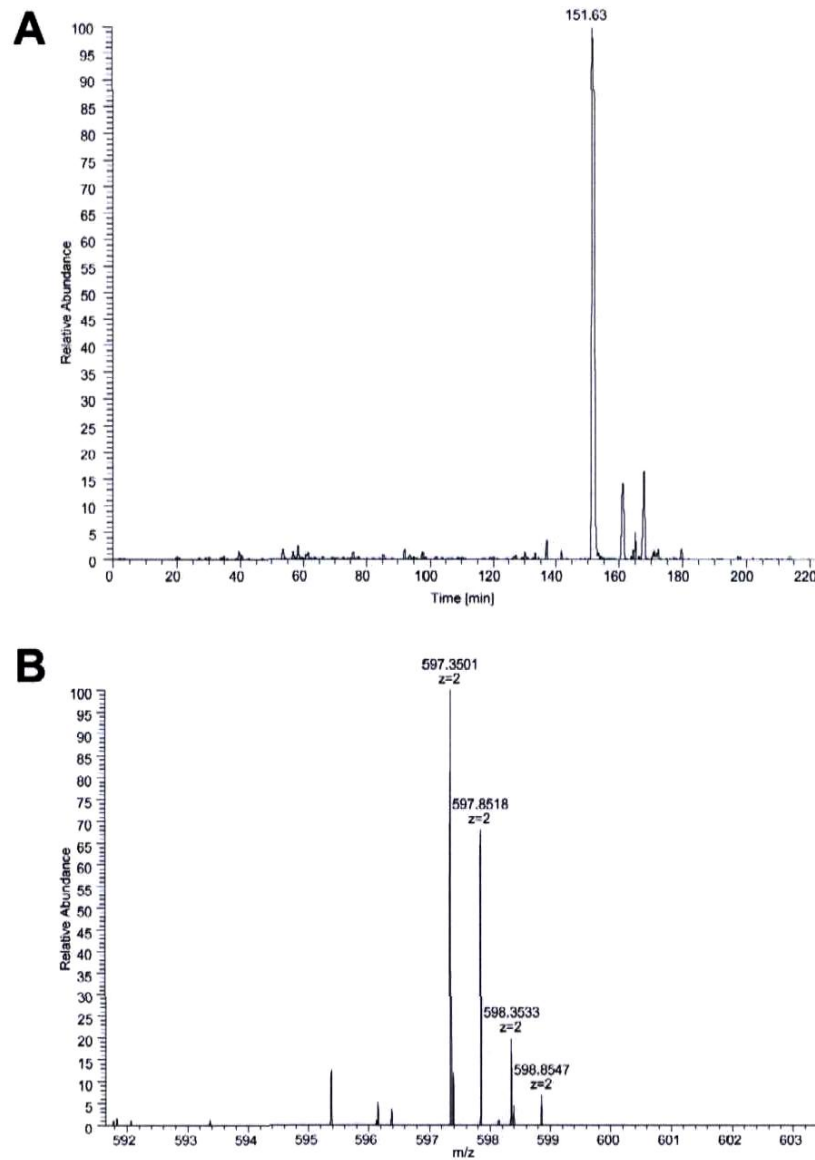
Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala  
1 5 10

10

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 15 1. Застосування фармацевтичної композиції, яка включає пептид, вибраний з:
- а) пептиду, який складається з послідовності SEQ ID NO: 63,  
б) пептиду за а), де вказаний пептид включає непептидні зв'язки, та  
в) пептиду за а), де вказаний пептид є частиною злитого білка,  
разом з прийнятними носіями або допоміжними речовинами, для виробництва лікарського  
засобу для лікування раку, де вказаний рак вибраний з раку шлунка, раку шлунково-кишкового  
20 тракту, колоректального раку, раку легенів або нирок.
2. Застосування пептиду за п. 1, де вказаний злитий білок містить N-термінальні амінокислоти  
HLA-DR антигенасоційованого інваріантного ланцюга (Ii).
3. Застосування активованих цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ), одержаних способом *in vitro*,  
який включає контактування *in vitro* ЦТЛ із навантаженими антигеном молекулами МНС людини  
25 I класу, що експресуються на поверхні відповідної антигенпрезентуючої клітини, протягом  
періоду часу, достатнього для активації вказаних ЦТЛ шляхом набуття ними специфічності до  
антигену, де вказаний антиген є пептидом за п. 1 а), який селективно розпізнає клітину, яка  
аберантно експресує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, вказану в п. 1 а),  
для виробництва лікарського засобу для лікування раку, де вказаний рак вибраний з раку  
30 шлунка, раку шлунково-кишкового тракту, колоректального раку, раку легенів або нирок.

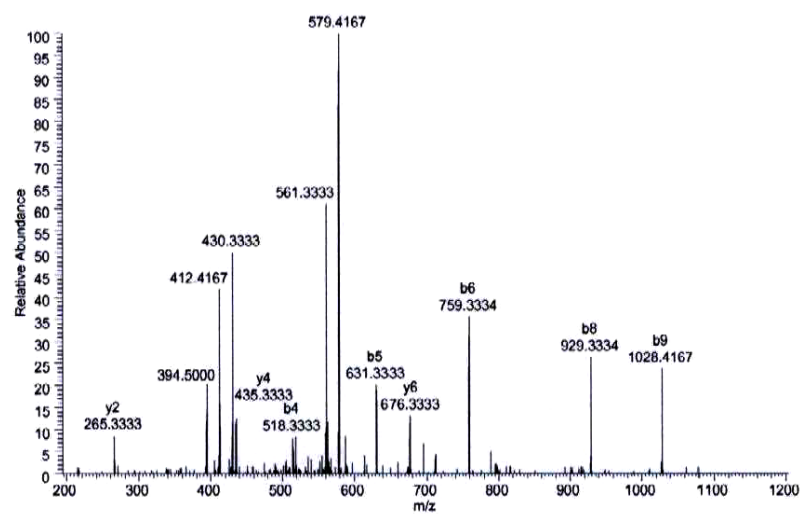
ФІГ. 1:



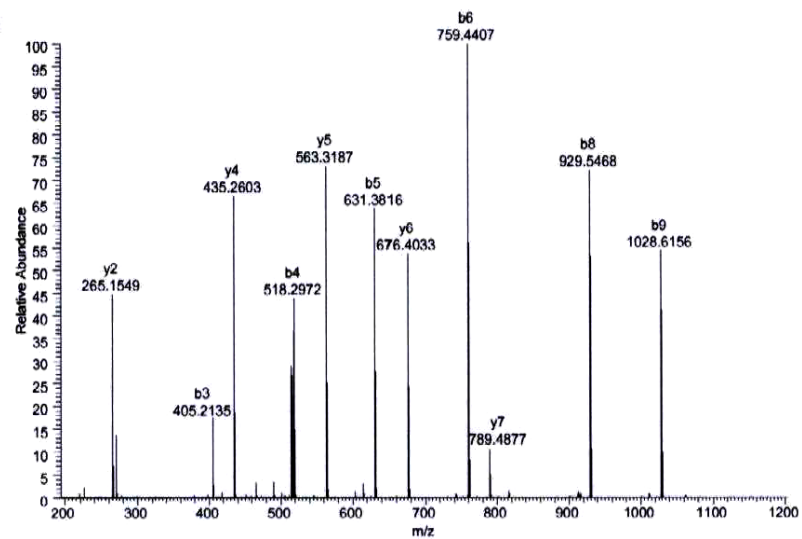
relative abundance → відносна кількість

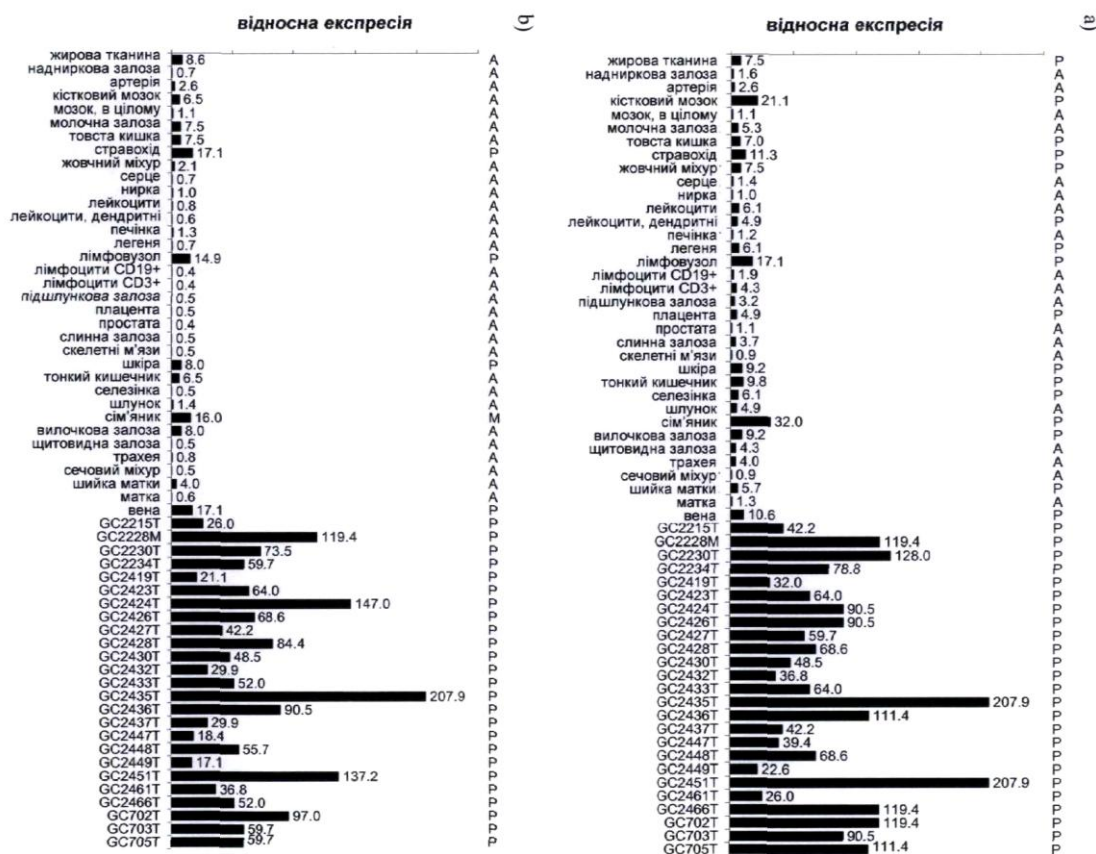
time [min] → час (хвилин)

**C**

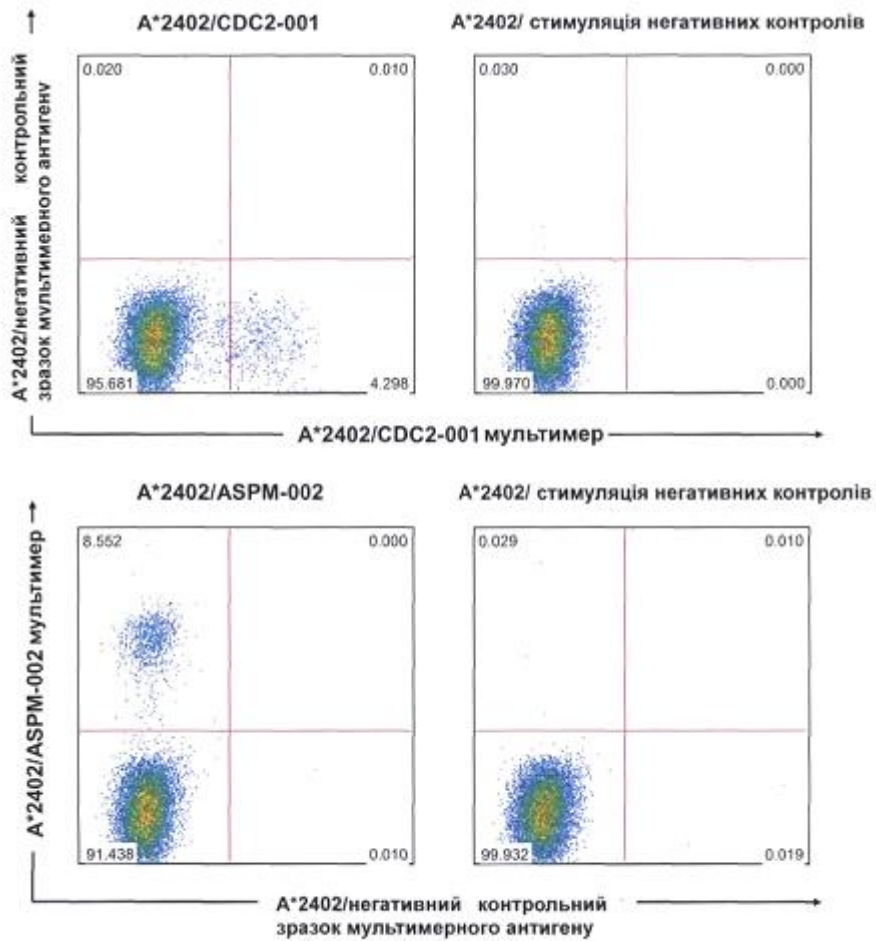


**D**





Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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