



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122661** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61K 38/08** (2019.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

A61P 35/00

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

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21)	Номер заявки:	<b>а 2016 00268</b>	(74)	Представник:	<b>Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70</b>
(22)	Дата подання заявки:	<b>04.08.2014</b>	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2004018633 A2, 04.03.2004 Prades C. et al. The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058 amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon. Cytogenetic and genome research, 2002, vol. 98, p. 160-168 US 2008107668 A1, 08.05.2008 US 2011229504 A1, 22.09.2011 WO 2009153992 A1, 23.12.2009 WO 2011089921 A1, 28.07.2011 EP 1760088 A1, 07.03.2007 WO 2009111507 A2, 11.09.2009 WO 2010045388 A2, 22.04.2010 Hofmann Hans-Srafan et al. Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. Clinacal cancer research, 2005, vol. 11, no. 3, p. 1086-1092 US 2011033516 A1, 10.02.2011 WO 03016471 A2, 27.02.2003 WO 2007096142 A2, 30.08.2007 US 2012156175 A1, 21.06.2012 Isabella T. Tai et al. Perlostin induction in tumor cell line explants and inhibition of in vitro cell growth by anti-periostin antibodies. Carcinogenesis, 2005, vol. 26, no. 5, p. 908-915 US 2011142865 A1, 16.06.2011 Yu Tian et al. Periostin and lung diseases: recent advances and molecular structure modeling. Archives of biological sciences, 2010, vol. 62, no. 4, p. 901-905
(24)	Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	<b>29.12.2020</b>			
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>1313987.8, 61/862,213, 1403297.3</b>			
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>05.08.2013, 05.08.2013, 25.02.2014</b>			
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву:	<b>GB, US, GB</b>			
(41)	Публікація відомостей про заяву:	<b>10.05.2016, Бюл.№ 9</b>			
(46)	Публікація відомостей про державну реєстрацію:	<b>28.12.2020, Бюл.№ 24</b>			
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/EP2014/066755, 04.08.2014</b>			
(72)	Винахідник(и): <b>Вайншенк Тоні (DE), Вальтер Штеффен (DE), Фрітше Йенс (DE), Зонг Колетт (DE), Зінгх Харпреет (DE)</b>				
(73)	Володілець (володільці): <b>ІММАТІКС БІОТЕКНОЛОДЖІС ГМБХ, Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany (DE)</b>				

UA 122661 C2

**(56)** Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
 Bin Li et al. Upregulation of periostin prevents P53-mediated apoptosis in SGC-7901 gastric cancer cells. *Molecular biology reports; An international journal on molecular and cellular biology*, vol. 40, no. 2, p. 1677-1683  
 Laura Morra et al. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows archive*, 2011, vol. 459, no. 5, p. 465-475  
 Guang-Hui Wang et al. Identification of MXRA5 as novel biomarker in colorectal cancer. *Oncology*, 2012, vol. 5, p. 544-548  
 Ronald J. Buckanovich et al. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer, *Journal of clinical oncology*, 2007, vol. 25, no. 7, p. 852-861

**(56)** Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
 Weinschenk Toni et al. et al. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines, *Cancer research*, 2002, vol. 62, no. 20, p. 5818-5827  
 Xiong Donghai et al. Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients, *Carcinogenesis*, 2012, vol. 33, no. 9, p. 1797-1805  
 Zou Tong-Tong et al. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene*, 2002, vol. 21, no. 31, p. 4855-4862

---

**(54) ПЕПТИД, ЯКИЙ МАЄ ЗДАТНІСТЬ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З МОЛЕКУЛОЮ МНС І КЛАСУ**

---

**(57) Реферат:**

Винахід стосується пептиду або його фармацевтично прийнятної солі, де вказаний пептид є епітопом пухлиноасоційованих пептидів, та застосування даного пептиду як лікарського засобу, де згаданий лікарський засіб виявляє активність проти раку. Винахід також стосується нуклеїнової кислоти, вектора експресії, клітини-хазяїна, фармацевтичної композиції, активованого цитотоксичного Т-лімфоциту або Т-хелперної клітини (Th-клітини), виділеного зв'язувального агента, який зв'язується з заявленим пептидом, та їх застосування як лікарського засобу, де лікарський засіб виявляє активність проти раку.

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 епітопів пухлино-асоційованих пептидів, що розпізнаються цитотоксичними Т-клітинами (ЦТЛ), самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованими пептидами, які

5 служать активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції. Цей винахід стосується 67 нових пептидних послідовностей та їх варіантів на основі молекул HLA I класу і HLA II класу пухлинних клітин людини, які можуть застосовуватися у вакцинних композиціях з метою викликати протипухлинну імунну відповідь.

Передумова створення винаходу

10 Рак легенів є найпоширенішою причиною смерті від раку як у чоловіків, так і у жінок. Рак легенів є найбільш поширеним типом раку на земній кулі що стосується як захворюваності, так і смертності. У 2008 році було вперше виявлено 1,61 мільйона нових випадків раку легенів і зареєстровано 1,38 мільйона смертей від нього. Найчастіше він спостерігається у Європі та Північній Америці.

15 Починаючи з 1987 року, щороку від раку легенів помирає більше жінок, ніж від раку молочної залози. Смертність серед чоловіків продовжує істотно зменшуватися приблизно на 1,9 % на рік, починаючи з 1991-2003 років. Смертність від раку легенів у жінок зараз виходить на плато після невпинного зростання протягом декількох десятиріч. Ця тенденція для смертності від раку легенів відображає зменшення кількості тих, хто палить, на протязі останніх 30 років.

20 Відповідно до прогнозу Національного інституту раку (NCI) США, у 2013 році у США очікується приблизно 230000 вперше виявлених випадків раку легенів і 160000 смертей від раку легенів.

25 Згідно з клінічною класифікацією, рак легенів поділяється на дрібноклітинний (13 %, ДРЛ) і недрібноклітинний (87 %, НДРЛ) для цілей лікування. Прогноз в цілому несприятливий. Серед хворих на рак легенів 5-річне виживання спостерігається у 15 % пацієнтів. Стадії розвитку пухлини на час виявлення часто є пізніми. Серед вперше виявлених хворих на НДРЛ у 30-40 % спостерігається стадія IV, а серед хворих на ДРЛ стадія IV спостерігається у 60 %.

30 Методи лікування залежать від типу (дрібноклітинний або недрібноклітинний) і стадії раку і включають хірургію, променеву терапію, хіміотерапію і таргетну біологічну терапію такими засобами як бевацизумаб (AVASTIN®) і ерлотиніб (TARCEVA®). Для локалізованих ракових пухлин лікуванням вибору зазвичай є хірургія. Нещодавні дослідження показали, що виживання для хворих на недрібноклітинний рак легенів на ранніх стадіях покращується при застосуванні хіміотерапії після хірургічного лікування. Оскільки захворювання на час виявлення є звичайно поширеним, часто застосовують променеву терапію і хіміотерапію, іноді в комбінації з хірургічним лікуванням. Хіміотерапія окремо і в поєднанні з променевою терапією є звичайно лікуванням вибору для дрібноклітинного раку. При застосуванні цієї схеми лікування у високого відсотка пацієнтів спостерігається ремісія, яка у деяких випадках є тривалою.

35 Однорічна виживаність у хворих на рак легенів дещо підвищилась із 37 % у 1975-1979 роках до 42 % у 2002 році, головним чином за рахунок удосконалення хірургічних методів і комбінованої терапії. Однак 5-річна виживаність для всіх стадій разом складає лише 16 %. Виживаність становить 49 % для випадків, коли хвороба виявляється на локальній стадії, однак лише 16 % випадків раку легенів діагностується на цій ранній стадії.

40 Незважаючи на наведене вище, все ще існує потреба в нових ефективних і безпечних методах лікування раку, такого як рак легенів, особливо недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ), рак шлунка і пухлини мозку різних фенотипів, які покращують самопочуття пацієнтів без використання хіміотерапевтичних засобів та інших засобів, що можуть призвести до серйозних побічних ефектів.

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

Коротке формулювання сутності винаходу

50 Згідно з першим аспектом цього винаходу, пропонується пептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або варіант його послідовності, який принаймні на 80 %, переважно принаймні на 90 % гомологічний (переважно принаймні на 80 % або принаймні на 90 % ідентичний) послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, де згаданий варіант індукує перехресну реакцію Т-клітин зі згаданим пептидом, або його фармацевтично прийнятну сіль, де згаданий пептид не є повнорозмірним поліпептидом.

60 За цим винаходом також пропонується пептид, що містить послідовність, вибрану з групи від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або його

варіант, який принаймні на 80 %, переважно принаймні на 90 % гомологічний (переважно принаймні на 80 % або принаймні на 90 % ідентичний) послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину для послідовностей від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 78 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, що складає від 8 до 100, переважно від 8 до 30, і найбільш переважно від 8 до 14 амінокислот, і для послідовностей SEQ ID NO 76 і 77, що складає від 12 до 100, переважно від 12 до 30, і найбільш переважно від 12 до 18 амінокислот.

У нижче наведеній таблиці описані пептиди за цим винаходом, їх відповідні SEQ ID NO і білки, з яких можуть походити ці пептиди. Усі пептиди в Таблицях 1a, 1b і 1c зв'язуються з HLA алелю A\*02, а пептиди в Таблиці 1d - з HLA-DR. Пептиди в Таблиці 1c також призначені для діагностики і (або) лікування рака шлунка і (або) гліобластоми.

Пептиди HLA II класу в Таблиці 1d також призначені для діагностики і (або) лікування рака шлунка та інших типів раку, пухлини яких надмірно експресують або надмірно презентують MMP12 або POSTN.

Таким чином, за цим винаходом зокрема пропонується пептид, що містить послідовність відповідно до SEQ ID NO 76, або його варіант, який принаймні на 80 %, переважно принаймні на 90 % гомологічний (переважно принаймні на 80 % або принаймні на 90 % ідентичний) послідовності SEQ ID NO 76, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину від 12 до 100, переважно від 12 до 30, і найбільш переважно від 12 до 18 амінокислот. За цим винаходом зокрема пропонується пептид, що містить послідовність відповідно до SEQ ID NO 76.

Також за цим винаходом зокрема пропонується пептид, що містить послідовність відповідно до SEQ ID NO 77, або його варіант, який принаймні на 80 %, переважно принаймні на 90 % гомологічний (переважно принаймні на 80 % або принаймні на 90 % ідентичний) послідовності SEQ ID NO 77, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину від 12 до 100, переважно від 12 до 30, і найбільш переважно від 12 до 18 амінокислот. За цим винаходом зокрема пропонується пептид, що містить послідовність відповідно до SEQ ID NO 77.

Таблиця 1a

## Пептиди за цим винаходом

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	Початковий білок (білки)
1	ABCA13-001	ILFEINPKL	ABCA13
2	MMP12-003	KIQEMQHFL	MMP12
3	ABCA13-002	ALDENLHQL	ABCA13
4	DST-001	NLIEKSIYL	DST
5	MXRA5-001	TLSSIKVEV	MXRA5
6	DST-002	KLDETNNLT	DST
7	CDK4-001	TLWYRAPEV	CDK4/ CDK6
8	HNRNPH-001	SMSGYDQVL	HNRNPH1, HNRNPH2
9	TANC2-001	ALMDKEGLTAL	TANC2
10	RNF213-001	VLSVVEVTL	RNF213
11	SLC34A2-001	VLLPVEVATHYL	SLC34A2
12	SMYD3-001	SLIEDLILL	SMYD3
13	AKR-001	YLIHFPVSV	AKR1C1, AKR1C2
14	RCN1-001	FQYDHEAFL	RCN1, RCN3
15	IL8-001	KLAVALLA	IL8
16	P2RY6-001	TVIGFLLPFA	P2RY6
17	HUWE1-001	RLLGPSAAADILQL	HUWE1
18	VCAN-001	TLYPHTSQV	VCAN
19	DROSHA-001	AVVEFLTSV	DROSHA
20	VCAN-002	ALVDHTPYL	VCAN
21	PLEKHA8-001	AILDITLEYEV	PLEKHA8
22	ACACA-001	FLIPIYHQV	ACACA
23	ITGA11-001	FLHHLEIEL	ITGA11
24	COL12A1-002	FLVDGSWSV	COL12A1
25	ELANE-001	GLYPDAFAPV	ELANE
26	SERPINB3-001	KLFGEKTYL	SERPINB3
27	KIF26B-001	TVAEVIQSV	KIF26B

Продовження Таблиці 1а

28	ANKH-001	SISDVIAQV	ANKH
29	NXF1-001	RLEEDDGDVAM	NXF1
30	RGS4-001	KIYNEFISV	RGS4
31	GFPT2-001	AIDGNNHEV	GFPT2
32	CERC-001	KLSWDLIYL	CERCAM
33	GALNT2-001	ALLRTVVSV	GALNT2
34	HNRNPM-001	ALGAGIERM	HNRNPM
35	BNC1-001	VLFPNLKTV	BNC1
36	FKBP10-001	TLVAIVVG	FKBP10
37	FZD-001	VLAPLFVYL	FZD1, FZD2, FZD7
38	ATP-001	SLHFLILYV	ATP2A1, ATP2A2
39	LAMC2-001	RLLDSVSRL	LAMC2
40	MXRA5-002	GLTDNIHLV	MXRA5
41	HSP-002	SILTIEDGIFEV	HSPA2, HSPA8
42	VPS13B-001	SLWGGDVVL	VPS13B
43	CSE1-001	ALFPHLLQPV	CSE1L
44	DPYSL4-001	NLLAEIHGV	DPYSL4
45	SEC61G-001	AIMGFIGFFV	SEC61G
46	ORMDL1-002	TLTNIIHNL	ORMDL1
47	PCNXL3-001	GVLENIFGV	PCNXL3
48	SNRNP20-001	GLIEIISNA	SNRNP200

Таблиця 1b

## Додаткові пептиди за цим винаходом

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	Початковий білок (білки)
49	SAMSN1-001	RLLJAAENFL	SAMSN1
50	STAT2-001	SLLPVDIRQYL	STAT2
51	CNOT1-001	YLAPFLRNV	CNOT1
52	SHMT2-001	ALLERGYSL	SHMT2
53	JUNB-001	YLPHAPPFA	JUNB
54	TACC3-001	KLVEFDLGA	TACC3
55	CNOT1-002	SLADFMQEV	CNOT1
56	RAD54B-001	SLYKGLLSV	RAD54B
57	EEF2-002	GLAEDIDKGEV	EEF2
58	CCNA2-001	SLIDADPYL	CCNA2
59	NET1-001	ILVSWLPRL	NET1
60	C11orf24-001	VVDKTLILLV	C11orf24
61	RCC1-001	TLISRLPAV	RCC1
62	MAGEF1-001	ILFPDIIARA	MAGEF1
63	NCAPD2-001	SLAGDVALQQL	NCAPD2
64	C12orf44-001	AMLAVLHTV	C12orf44
65	HERC4-001	KVLEILHRV	HERC4

Таблиця 1с

Додаткові пептиди, які також надмірно  
експресовані в клітинах гліобластомії (або) раку шлунка

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	Початковий білок (білки)
66	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3
67	CDC6-001	ILQDRLNQV	CDC6
68	FAP-003	YVYQNNIYL	FAP
69	WNT5A-001	AMSSKFFLV	WNT5A
70	TPX2-001	KILEDVVG	TPX2
71	HMMR-001	KLLEYIEEI	HMMR
72	ADAM8-001	KLLTEVHAA	ADAM8
73	COL6A3-002	FLLDGSANV	COL6A3
74	THY1-001	SLLAQNTSWLL	THY1
75	DIO2-001	ALYDSVILL	DIO2

Таблиця 1d

Пептиди за цим винаходом, зв'язані з молекулами МНС II класу

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	Початковий білок (білки)
76	MMP12-002	INNYTPDMNREDVDYAIR	MMP12
77	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	POSTN

Таблиця 1е

Додаткові переважні пептиди за цим винаходом,  
присутні у надлишку в інших типах ракових клітин

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	Початковий білок (білки)
78	SLI-001	SLYDNQITTV	SLIT1, SLIT2
79	TLX3-001	SLAPAGVIRV	TLX3
80	CEP192-001	SLFGNSGILENV	CEP192
81	ANKS1A-001	ALYGRLEV	ANKS1A
82	CEP250-002	ALWEKNTHL	CEP250
83	MDN1-001	ALANQKLYSV	MDN1
84	OLFM1-001	ILMGTELTQV	OLFM1
92	NEFH-001	HLLEDIAHV	NEFH

Таблиця 1f

Додаткові пептиди за цим винаходом, присутні у надлишку в інших типах ракових клітин

SEQ ID NO:	Код пептиду	Послідовність	Початковий білок (білки)
85	BUB1B-001	KIVDFSYSV	BUB1B
86	PI4KA-001	AMATESILHFA	PI4KA
87	AURKB-001	RVLPPSALQSV	AURKB
88	SLC3A2-001	SLLESNKDLLL	SLC3A2
89	IFT81-001	ALASVIKEL	IFT81
90	COG4-001	SLVAVELEKV	COG4
91	NCBP1-001	AMFENFVSV	NCBP1

5

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

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид складається або по суті складається з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92.

10

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

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид є частиною злитого білку, зокрема злитого із N-термінальними амінокислотами HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii), або злитим із послідовністю антитіла (або вбудованим у послідовність антитіла), наприклад, антитіла, специфічного до дендритних клітин.

Цей винахід також стосується нуклеїнової кислоти, що кодує пептиди за цим винаходом.

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

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

Цей винахід також стосується пептиду за цим винаходом, нуклеїнової кислоти за цим винаходом або вектору експресії за цим винаходом для застосування в медицині.

Цей винахід також стосується антитіл за цим винаходом та способів їх отримання.

Цей винахід також стосується Т-клітинних рецепторів (ТКР), зокрема розчинних ТКР (рТКР) за цим винаходом та способів їх отримання.

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

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

Цей винахід також стосується клітини-хазяїна за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина є дендритною клітиною.

Цей винахід також стосується способу отримання пептиду за цим винаходом, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна за цим винаходом 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 антиген-презентуючої клітини протягом періоду часу, достатнього для активації згаданого ЦТЛ шляхом набуття ним специфічності до антигену, де згаданий антиген є будь-яким із пептидів за цим винаходом.

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

Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина містить вектор експресії, здатний експресувати згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 92, переважно такий, що містить послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65 і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або згаданий варіант амінокислотної послідовності.

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

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

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

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

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

Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де згадані ракові клітини є клітинами ракової пухлини легенів, клітинами раку шлунка, шлунково-кишкового тракту, кишечника, підшлункової залози або клітинами раку нирки і клітинами гліобластоми.

Цей винахід також стосується конкретних маркерних білків і біомаркерів на основі пептидів за цим винаходом, які можуть використовуватися в діагностиці і визначенні прогнозу раку

легенів, шлунка, шлунково-кишкового тракту, кишечника, підшлункової залози або нирки і гліобластоми.

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

5 Симуляція 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 задіяння як гуморальної, так і клітинної ланки імунної системи.

10 Специфічні елементи клітинної імунної відповіді 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. Важливу роль у цій відповіді відіграють, зокрема, CD8-позитивні Т-клітини, які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності I класу (MHC). Ці пептиди зазвичай складаються з 8-10 амінокислотних залишків, що отримані з білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP), які містяться у цитозолі. Молекули MHC людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

Існує два класи молекул MHC. Молекули MHC I класу можна виявити в більшості клітин, що мають ядро. Молекули MHC складаються з альфа-важких ланцюгів і бета-2-мікроглобуліну (рецептори молекул MHC I класу) або альфа- і бета-ланцюгів (рецептори молекул MHC II класу), відповідно. Їхня просторова конформація приводить до утворення зв'язувальної щілини, що використовується для нековалентної взаємодії з пептидами. Молекули MHC I класу презентують пептиди, які утворюються в результаті розщеплення протеолітичними ферментами переважно ендогенних білків, продуктів DRIP та більш великих пептидів. Молекули MHC II класу містяться головним чином на професійних антигенпрезентуючих клітинах (АПК) і презентують головним чином пептиди екзогенних або трансмембранних білків, які поглинаються АПК в ході ендочитозу і згодом процесуються. Комплекси пептидів і молекул MHC I класу розпізнаються CD8-позитивними цитотоксичними Т-лімфоцитами, що несуть відповідний Т-клітинний рецептор (ТКР), в той час як комплекси пептиду і молекул MHC II класу розпізнаються CD4-позитивними Т-хелперами, що несуть відповідний ТКР. Загальновідомо, що ТКР, пептид і MHC присутні у стехіометричних кількостях у співвідношенні 1:1:1.

CD4-позитивні Т-хелпери відіграють важливу роль, викликаючи та підтримуючи ефективну відповідь CD8-позитивних цитотоксичних Т-клітин. Ідентифікація епітопів CD4-позитивних Т-клітин, отриманих із пухлино-асоційованих антигенів (ТАА), може мати велике значення під час розробки фармацевтичних засобів для ініціювання протипухлинних імунних реакцій (Kobayashi et al., 2002; Qin et al., 2003; Gnjjatic et al., 2003). У місці локалізації пухлини Т-хелперні клітини підтримують сприятливе для ЦТЛ цитокінове середовище (Mortara et al., 2006) і притягують ефекторні клітини, такі як ЦТЛ, NK-клітини, макрофаги, гранулоцити (Hwang et al., 2007).

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

45 На моделях тварин-ссавців, наприклад, на мишах, було показано, що навіть за відсутності ефекторних клітин, таких як ЦТЛ (тобто CD8-позитивних Т-лімфоцитів), присутності CD4-позитивних Т-клітин виявляється достатньо для послаблення клінічних проявів пухлин шляхом інгібування ангиогенезу за рахунок секреції інтерферону-гамма (IFN $\gamma$ ).

50 Крім цього, було показано, що CD4-позитивні Т-клітини, які розпізнають пептиди з пухлино-асоційованих антигенів, презентовані молекулами HLA II класу, можуть протидіяти прогресуванню пухлин шляхом індукції відповіді антитіл (Ab).

На відміну від пухлино-асоційованих пептидів, що зв'язуються з молекулами HLA I класу, на цей час було описано лише невелике число лігандів II класу для пухлино-асоційованих антигенів (ТАА).

55 Оскільки конститутивна експресія молекул HLA II класу зазвичай обмежується клітинами імунної системи, вважалося неможливим виділити пептиди II класу безпосередньо з первинних пухлин. Однак Dengjel і співавт. вдалося ідентифікувати декілька зв'язаних з молекулами MHC II класу епітопів безпосередньо із пухлин (WO 2007/028574, EP 1760088B1; (Dengjel et al., 2006).

60 Антигенами, які розпізнаються пухлино-специфічними цитотоксичними Т-лімфоцитами, тобто їхні епітопами, можуть бути молекули, що отримані з усіх класів білків, таких як ферменти,



рецептори, фактори транскрипції тощо, які експресуються і, у порівнянні з незміненими клітинами того ж походження, активність яких підвищена у клітинах відповідної пухлини.

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

Цей винахід стосується також двох нових і дуже прийнятних пептидів, зв'язаних з молекулами МНС II класу (що містять послідовності відповідно до SEQ ID NO 76 і SEQ ID NO 77). Ці пептиди особливо прийнятні для діагностики і (або) лікування раку шлунка, НДРЛ та інших типів раку, при яких клітини надмірно експресують і (або) надмірно презентують MMP12 і POSTN, відповідно.

Цей винахід стосується також так званих відмінних за довжиною варіантів пептидів, зв'язаних з молекулами МНС II класу відповідно до винаходу, що містять послідовності відповідно до SEQ ID NO 76 або SEQ ID NO 77. Як згадано вище, пептид, який містить послідовність відповідно до SEQ ID NO 76, складається з амінокислотної послідовності INNYTPDMNREDVDYAIR (фермент MMP12), і пептид, який містить послідовність відповідно до SEQ ID NO 77, складається з амінокислотної послідовності TNGVIHVVDKLLYPADT (POSTN-002-пептид). Ці відмінні за довжиною варіанти зазвичай є подовженими на N- і (або) C-кінці (на 1 – 5, переважно на 1 – 10 амінокислот) або вкороченими на N- і (або) C-кінці (на 1 – 5 амінокислот) пептидами, які все ще здатні зв'язуватися з молекулами МНС і викликати клітинну імунну відповідь як описано тут. Як відомо фахівцям у цій галузі, пептиди, зв'язані з білками II класу, не мають обмежень у розмірі і можуть мати довжину від 11 до 30 амінокислот. Зв'язувальна щільність пептиду у молекулах МНС II класу відкрита з обох кінців, що робить можливим зв'язування пептидів з відносно великою довжиною. Хоча "основний" сегмент довжиною у дев'ять залишків має найбільший внесок у розпізнавання пептиду, фланкуючі ділянки також важливі для забезпечення специфічності пептиду до молекул II класу (див., наприклад, Meydan C, et al., Prediction of peptides binding to MHC class I and II alleles by temporal motif mining. BMC Bioinformatics. 2013; 14 Suppl 2: S13. Epub 2013 Jan 21). Використовуючи усі доступні інструменти програмного забезпечення (наприклад, які описані вище), фахівці у цій галузі мають змогу ідентифікувати зв'язувальний мотив і у такий спосіб ідентифікувати можливість подовжити і (або) вкоротити пептиди, зв'язані з молекулами МНС II класу, які містять послідовності відповідно до SEQ ID NO 76 або SEQ ID NO 77, з метою створення відмінних за довжиною варіантів.

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

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 цитотоксичними Т-лімфоцитами, тобто їхніми епітопами, можуть бути молекули, що отримані з усіх класів білків, таких як ферменти, рецептори, фактори транскрипції тощо, які експресуються і, у порівнянні з незміненими клітинами того ж походження, активність яких підвищена у клітинах відповідної пухлини.

Сучасна класифікація пухлино-асоційованих антигенів 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 пухлино-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 беруть участь у біосинтезі меланіну і тому не є пухлино-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.

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

10 d) 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 і (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.

20 e) ТАА, що виникають в результаті посттрансляційних модифікацій. Такі ТАА можуть виникати з білків, які не є ні специфічними, ні надмірно експресованими у пухлинах, але, незважаючи на це, стають асоційованими з пухлинами в результаті посттрансляційних процесів, первинно активних у пухлинах. Прикладами ТАА цього класу є антигени, що виникають в результаті змінень характеру гликозилювання, що приводить до утворення у пухлинах нових епітопів, таких як MUC1, або таких подій як білковий сплайсинг під час деградації, які можуть 25 бути пухлино-специфічними, а можуть і не бути.

f) 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, E6 і E7, які експресуються клітинами карциноми шийки матки.

30 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, або в іншому переважному втіленні вищезгаданий пептид 35 має надмірно презентуватися пухлинними клітинами у порівнянні з нормальними здоровими тканинами. До того ж бажано, щоб відповідний антиген не тільки був присутнім у пухлині певного типу, але також був присутнім у високих концентраціях (тобто, як декілька копій відповідного пептиду на клітину). Пухлино-специфічні та пухлино-асоційовані антигени часто отримують із білків, які беруть безпосередню участь у трансформації нормальної клітини в 40 пухлинну клітину, завдяки їх функції, наприклад, в контролі клітинного циклу або пригніченні апоптозу. Крім цього, низхідні мішені білків, що також є безпосередньою причиною трансформації, можуть мати підвищену експресію і, таким чином, можуть бути опосередковано пухлино-асоційованими. Такі опосередковано пухлино-асоційовані антигени також можуть бути мішенями у вакцинаційному підході (Singh-Jasuja et al., 2004). В обох випадках важливим є те, 45 щоб в амінокислотній послідовності антигену були присутні епітопи, оскільки такий пептид ("імуногенний пептид"), отриманий із пухлино-асоційованого антигену, має приводити до відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

По суті, будь-який пептид, що здатний зв'язуватися з молекулою МНС, може відігравати роль епітопу Т-клітини. Передумовою індукції відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo* є присутність 50 Т-клітин із відповідним ТКР 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 55 тканинами.

Проте ідентифікація генів, які надмірно експресуються пухлинними тканинами або лініями пухлинних клітин людини, або селективно експресуються в таких тканинах або клітинних лініях, не дає точної інформації щодо використання антигенів, що кодуються цими генами, в імунній 60 терапії. Причиною цього є те, що тільки окрема субпопуляція епітопів цих антигенів придатна

для такого застосування, оскільки має бути присутня Т-клітина з відповідним ТКР, і імунологічна толерантність по відношенню до цього епітопу повинна бути відсутньою або мінімальною. Отже, у більш переважному втіленні цього винаходу важливо вибрати тільки ті надмірно або селективно презентовані пептиди, проти яких можна знайти функціонуючу Т-клітину і (або) Т-клітину, здатну до проліферації. Така функціонуюча Т-клітина визначається як Т-клітина, яка за стимуляції специфічним антигеном може бути клонована і здатна виконувати функції ефектора ("ефекторна Т-клітина").

У разі використання ТКР і антитіл за цим винаходом імуногенність їх пептидів є вторинною. Для ТКР і антитіл за цим винаходом презентація є визначальним фактором.

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, які включають цитотоксичні функції, спрямовані проти пухлинних клітин, що експресують комплекси пухлино-асоційованого пептиду/MHC на поверхнях своїх клітин. У такий спосіб епітопи пухлино-асоційованих пептидів Т-хелперів самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованими пептидами можуть служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції.

Застосування проти інших типів раку розкрито у наведеному нижче описі білків або пептидів за цим винаходом.

АТФ-зв'язувальні касетні транспортери, підсімейство А (ABC1), член 13 (ABCA13)

У людини сімейство АТФ-зв'язувальних касетних (ABC) трансмембранних транспортерів складається з 48 генів і 7 підсімейств генів. Очікуваний білок ABCA13 складається з 5058 амінокислотних залишків, що робить його найбільшим білком ABC, описаним на цей час (Prades et al., 2002). Knight і співавтори визначили, що білок ABCA13 експресується у гіпокампі та корі головного мозку мишей та людини і що обидві структури мають відношення до шизофренії та біполярного розладу (Knight et al., 2009). Ген ABCA13 картується в локусі 7p12.3 хромосоми, на ділянці, що містить джерело спадкового порушення, яке вражає підшлункову залозу (синдром Швахмана-Даймонда), а також є локусом, задіяним в участі Т-клітин у пухлинній інвазії та розвитку метастазів (INM7), і таким чином є позиційним кандидатом на спричинення цих патологій (Prades et al., 2002).

Матрична металопротеїназа 12 (еластаза макрофагів) (MMP12)

MMP12, відома також під назвою металоеластаза людини (HME) або макрофагальна металоеластаза (MME) є цинк-залежною ендопептидазою, яка відома своєю здатністю розкладати еластин. Окрім цього, вона має широкий діапазон субстратів, що поширюється на інші матричні білки, такі як колаген, фібронектин, ламінін, протеоглікани, та нематричні білки, такі як альфа-1-антитрипсин. У хворих на астму, емфізему та хронічне обструктивне захворювання легенів (ХОЗЛ) MMP12 може сприяти деструкції альвеол і структурним змінам в дихальних шляхах (Calaldo et al., 2003; Wallace et al., 2008). MMP12 бере участь у міграції макрофагів, і оскільки за її участю з плазмінотину утворюється ангіостатин, вона сприяє інгібуванню ангіогенезу (Chakraborti et al., 2003; Chandler et al., 1996; Sang, 1998). Як і інші металопротеїнази, MMP12 бере участь у фізіологічних процесах, таких як ембріогенез, загоєння ран, та у менструальному циклі (Chakraborti et al., 2003; Labicd et al., 2009), але також і у патологічних процесах деструкції тканин.

Хоча у ряді випадків дані базуються на спостереженні за невеликою кількістю пацієнтів, існує достатньо доказів у літературі, що MMP12 часто надмірно експресована у хворих на рак (Denys et al., 2004; Hagemann et al., 2001; Ma et al., 2009; Vazquez-Ortiz et al., 2005; Ye et al., 2008). У той же час, дані щодо впливу надмірної експресії MMP12 на клінічні параметри та прогноз захворювання є суперечливими. Хоча вона може мати відношення до розчинення матриксу і, у такий спосіб, до утворення метастазів, вона може також інгібувати ріст пухлин шляхом продукування ангіостатину, що негативно впливає на ангіогенез (Gorrin-Rivas et al., 2000; Gorrin Rivas et al., 1998; Kim et al., 2004).

Для раку легенів зв'язок з рівнем експресії MMP12 є суперечливим. Надекспресія MMP12 у епітеліальних клітинах була зареєстрована у випадку структурних змін у легенях внаслідок їх запалення. Експресія MMP12 на високому рівні може відігравати роль у розвитку раку легенів як ускладнення емфіземи (Qu et al., 2009). Дослідження на тваринах свідчать, що експресія MMP12 клітинами строми або макрофагами пригнічує ріст пухлин легенів (Acuff et al., 2006; Houghton et al., 2006). Однак існують також звіти, які свідчать, що надмірна експресія MMP12 у пухлинах легенів корелює з рецидивами, метастатичною хворобою та більш короткою безрецидивною виживаністю після резекції (Cho et al., 2004; Hofmann et al., 2005).

Дистонін (DST)

DST (BPAG1-e) кодує члена сімейства плакінових білків у складі білків бляшок зчеплення. BPAG1-e експресується в епітеліальних тканинах, забезпечуючи заякорювання проміжних мікрофіламентів, які містять кератин, на гемідесмосомах (HD). HD являють собою мультибілкові адгезивні комплекси, що сприяють адгезії епітелію до строми у багатошаровому і складному епітелії. Модуляція їх функції є надзвичайно важливою для багатьох біологічних процесів, таких як диференціація та міграція кератиноцитів під час загоєння ран та інвазія карциноми, за яких клітини відділяються від субстрату та набувають мобільний фенотип (Litjens et al., 2006).

Злоякісна меланома є однією з найбільш агресивних типів пухлин. BPAG1 експресується у лініях клітин меланоми людини (A375 і G361) і у нормальних меланоцитах людини. Рівні аутоантитіл проти BPAG1 у сироватці пацієнтів з меланомою були істотно вищими, ніж у сироватці здорових добровольців ( $p < 0,01$ ). Аутоантитіла проти BPAG1 можуть слугувати багатообіцяючим маркером для діагностики меланоми (Shimbo et al., 2010). DST зв'язаний з інвазією раку молочної залози (Schuetz et al., 2006). Ймовірно, що ген BPAG1 залучений до процесів проліферації, апоптозу, інвазії та метастазування назофарингеальної карциноми NPC (Fang et al., 2005).

#### Фактор ремоделювання матриксу 5 (MXRA5)

MXRA5, відомий також під назвою "адлікан", кодує адгезивний білок протеоглікан і належить до групи генів, що беруть участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу та міжклітинній адгезії (Rodningen et al., 2008). Хоча функція MXRA5 у ракових захворюваннях невідома, у зразках пухлин, що вражали різні тканини, таких як шкіра, головний мозок, легені і яєчник, були виявлені соматичні мутації в MXRA5. Проведене дослідження адлікану (MXRA5) методом ЗТ-ПЛР підтвердило результати, отримані методами на базі мікрочипів, що свідчать про надекспресію у ракових пухлинах товстої кишки у порівнянні з нормальними тканинами товстої кишки (13 пухлин і 13 нормальних тканин кишечника) (Zou et al., 2002). У нещодавно проведеному дослідженні фактор ремоделювання матриксу 5 виявився другим за частотою мутованим геном для НДРЛ (першим є TP53) (Xiong et al., 2012).

#### Циклін-залежна кіназа 4 (CDK4) / циклін-залежна кіназа 6 (CDK6)

CDK4 є членом сімейства протеїнкіназ Ser/Thr. Вона є каталітичною субодиницею протеїнкіназного комплексу, який відіграє важливу роль у проходженні фази G1 клітинного циклу. Активність цієї кінази проявляється тільки під час переходу клітини від фази G1 до S-фази клітинного циклу, та її експресія головним чином регулюється на рівні транскрипції (Xiao et al., 2007). Ферменти CDK4 і CDK6 та регулятори їхньої активності, наприклад, цикліни, відіграють ключову роль у ембріогенезі, гомеостазі та канцерогенезі (Graf et al., 2010).

У тканинах ракових пухлин легенів рівень експресії білка CDK4 був значно вищим у порівнянні з нормальними тканинами ( $P < 0,001$ ). У пацієнтів з більш високою експресією CDK4 спостерігалась значно менша тривалість життя, ніж у пацієнтів з низькою експресією CDK4. Багатимірний аналіз дав підстави для припущення, що рівень експресії CDK4 є незалежним прогностичним індикатором ( $P < 0,001$ ) для оцінки виживання пацієнтів з раком легенів. Крім цього, пригнічення експресії CDK4 також значно підвищує експресію регулятора клітинного циклу p21 (Wu et al., 2011a). У клітинах легенів, які експресують K-Ras онкоген, пригнічення Cdk4, але не Cdk2 або Cdk6, негайно індукує клітинне старіння. Ніяких подібних реакцій не спостерігається у легенях за умов експресії лише алеля Cdk4 або у інших клітинах, що експресують K-Ras. Цілеспрямована дія на алелі гену Cdk4 у поширених пухлинах, що виявляються під час комп'ютерної томографії, також призводить до клітинного старіння і попереджає прогресування пухлини (Puyol et al., 2010).

Гетерогенний ядерний рибонуклеопротейн H1 (H) (HNRNPH1)/гетерогенний ядерний рибонуклеопротейн H2 (H') (HNRNPH2)

Ці гени належать до підсімейства повсюдно експресованих гетерогенних ядерних рибонуклеопротейнів (гяРНП). Представники підсімейства гяРНП є РНК-зв'язувальними білками, і вони утворюють комплекси з гетерогенною ядерною РНК (гяРНК). Ці білки асоційовані з пре-мРНК у ядрі, і, напевно, впливають на процесинг пре-мРНК та інші аспекти метаболізму і транспорту мРНК.

Очевидно, гяРНП-H бере участь у патогенезі и прогресуванні злоякісних гліом у ролі перемикача на альтернативну схему сплайсингу, яка призводить до утворення онкогенного варіанта білка, що може відображати реактивацію стовбурових клітин, і є посередником у багатьох ключових аспектах агресивної поведінки пухлин, включаючи уникання апоптозу та інвазивність (Lefave et al., 2011). Нокдаун гяРНП-H або A-Raf, опосередкований малими інтерферуючими РНК, призводив до MST2-залежного апоптозу. Навпаки, примусова експресія або гяРНП-H, або A-Raf частково протидіє апоптозу, спричиненому етопозидом (Rauch et al., 2010). Була виявлена експресія гяРНП-H/H' на високому рівні у декількох видах клітин, які

зазвичай експресують низькі рівні гЯРНП-Н/Н' у цитоплазмі, наприклад, у аденокарциномі підшлункової залози, гепатоцелюлярній карциномі і карциномі шлунка (Honore et al., 2004).

Тетратрикопептидний повтор, анкіриновий повтор і білок 2, що містить біспіральний домен (TANC2)

5 Сімейство TANC складається з TANC1 і TANC2, що було виявлено у 2005 році (Han et al., 2010). Сімейство білків TANC бере участь у регуляції дендритних шипиків, просторовому навчанні та розвитку ембріону, оскільки дефіцит TANC1 у мишей зменшує щільність дендритних шипиків у гіпокампу і призводить до порушень просторового навчання, в той час як дефіцит TANC2 викликає смертність ембріонів. У протилежність цьому, надекспресія TANC1 і TANC2 у

10 культурі нейронів підвищує щільність дендритних шипиків і збуджувальних синапсів. Білки TANC1 і 2 переважно експресуються у головному мозку, де значна частка білка міститься у везикулярних мембранах (Han et al., 2010).

Білок з доменом Ring finger 213 (RNF213)

15 RNF213 кодує білок, що містить домен Ring finger типу C3HC4, який є спеціалізованим типом Zn-finger, що зв'язує два атоми цинку і, як вважають, є посередником міжбілкової взаємодії.

Група дослідників навела докази, що вперше дозволяють припустити участь RNF213 у генетичній схильності до хвороби Мойамойа (Liu et al., 2011b). В іншому дослідженні було показано, що з геном RNF213 пов'язана схильність китайської етнічної групи ханьців до хвороби

20 Мойамойа (Wu et al., 2012).

Сімейство переносників розчинних речовин 34 (фосфат натрію), член 2 (SLC34A2)

SLC34A2 є рН-чутливим натрій-залежним переносником фосфатів. Підвищена експресія гену SLC34A2 у високодиференційованих пухлинах може відображати процеси диференціації клітин під час канцерогенезу пухлин яєчників і може служити потенційним маркером у

25 діагностиці і прогнозі перебігу раку яєчників (Shyian et al., 2011). Дослідження методом ЗТ-ПЛР підтвердило підвищену експресію SLC34A2 у хворих на папілярний рак щитоподібної залози (Kim et al., 2010b). Спостерігається також значно підвищений рівень експресії гену SLC34A2 у тканинах раку молочної залози у порівнянні з нормальними тканинами (Chen et al., 2010a).

Білок 3, що містить домени SET і MYND (SMYD3)

30 Раніше повідомлялося, що підвищена регуляція SMYD3, гістону H3 лізин-4-специфічної метилтрансферази, відіграє ключову роль у проліферації колоректальної карциноми (КРК) і гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК). В іншому дослідженні було виявлено, що експресія SMYD3 також є підвищеною у тканинах переважної більшості типів раку молочної залози. Аналогічно до КРК і ГЦК, сайленсинг цього гена SMYD3 малими інтерферуючими РНК приводить до

35 інгібування росту клітин раку молочної залози, що дозволяє припустити, що підвищена експресія SMYD3 є також суттєвим чинником для проліферації клітин раку молочної залози (Hamamoto et al., 2006). Нокдаун SMYD3 РНК-інтерференцією знижує експресію c-Met і інгібує міграцію клітин і їх інвазію, індуковану фактором росту гепатоцитів (HGF) (Zou et al., 2009). SMYD3 відіграє вирішальну роль у проліферації клітин HeLa та їх міграції/інвазії, і він може бути

40 прийнятною терапевтичною мішенню в карциномах шийки матки людини (Wang et al., 2008b).

Альдокеторедуктаза 1-го сімейства, член C1 (AKR1C1) / альдокеторедуктаза 1-го сімейства, член C2 (AKR1C2)

AKR1C1 і AKR1C2 розрізняються лише сімома амінокислотними залишками (Le et al., 2010). AKR1C1 і AKR1C2 регулюють активність андрогенів, естрогенів і прогестерону, а також

45 зайнятість і трансактивацію відповідних рецепторів (Penning et al., 2000; Steckelbroeck et al., 2004). Ферменти AKR1C, за виключенням AKR1C4, який є печінко-специфічним, експресуються у різних нормальних і хворих тканинах, і, таким чином, пов'язані з кількома хворобами, такими як рак легенів, молочної залози, передміхурової залози, ендометрію, мієлоїдна лейкемія тощо (Brozic et al., 2011; Burns et al., 2011). Чутливість до цисплатину, очевидно, пов'язана з рівнями

50 AKR1C у лініях епітеліальних клітин раку легенів (Chen et al., 2010b) і у пацієнтів із НДРЛ (Kuang et al., 2012; Stewart, 2010). Таким чином, надекспресія AKR1C є індикатором несприятливого прогнозу та резистентності до засобів хіміотерапії при лікуванні недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ) людини (Wang et al., 2007). Надекспресія AKR1C також асоціюється з прогресуванням хвороби на рак передміхурової залози (Huang et al., 2010). Виснаження експресії AKR1C2 за допомогою RNAi інгібує онкогенез in vivo та in vitro, що є певним свідченням того, що AKR1C2

55 мiРНК може відігравати ключову роль у блокуванні гепатокарценогенезу (Dong-Dong, 2007).

Ретикулокальбін 1, кальцій-зв'язуючий білок із доменом "EF-hand" (RCN1) / ретикулокальбін 3, кальцій-зв'язуючий білок із доменом "EF-hand" (RCN3)

60 Ретикулокальбін 1 є кальцій-зв'язуючим білком, що міститься у порожнині ендоплазматичного ретикулу (ER). Імуногістохімічне дослідження показало широке

розповсюдження RCN по різних органах ембріонів та дорослих людей, головним чином, по органах ендокринної та екзокринної систем. Надекспресія RCN може відігравати певну роль у онкогенезі, інвазії пухлини та лікарській резистентності (Fukuda et al., 2007). Ретикулокальбін 1 (RCN1) є білком, зв'язаним з клітинною поверхнею як на лініях клітин ендотелію (EC), так і на лініях клітин раку передміхурової залози (PCa). Експресія RCN1 на поверхні клітин ставала підвищеною під впливом лікування фактором некрозу пухлини альфа, отриманому з ендотеліальних клітин кісного мозку (Cooper et al., 2008). Має місце позитивна регуляція RCN1 у колоректальної карциномі (КРК), і він локалізований у ракових клітинах або у стромальних клітинах, що оточують ракові клітини. Він може бути новим кандидатом у маркери КРК (Watanabe et al., 2008). RCN3 є членом сімейства CREC (Ca45/ретикулокальбін/ERC45/калуменін) Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючих білків із доменом "EF-hand", які належать до секреторного каскаду (Tsuji et al., 2006). Вважається, що у олігодендрогліомах RCN3 є потенційно важливим геном-кандидатом. Хоча про функцію RCN3 відомостей обмаль (Drucker et al., 2009).

#### Інтерлейкін 8 (ІЛ8)

ІЛ8 є хемокіном сімейства CXC, яке включає головних медіаторів запальної відповіді. Цей хемокін секретується клітинами декількох типів. Він виконує функцію хемоатрактанта, а також він є активним ангіогенним фактором. Хемокіни CXC (ELR+), такі як ІЛ-8, спричиняють ангіогенез і можуть відігравати важливу роль в онкологічних захворюваннях, які мають ангіогенний фенотип, наприклад, НДРЛ (Arenberg et al., 1997). Нещодавно було з'ясовано, що ІЛ-8 пухлинного походження діє як атрактант для циркулюючих пухлинних клітин, спричиняючи їх повернення до вихідної пухлини (рак молочної залози, рак товстої кишки і меланоми), призводячи до більш агресивного фенотипу пухлин (Kim et al., 2009). Рівні ІЛ-8 асоційовані з ризиком виникнення раку легенів ще за декілька років до встановлення діагнозу. Комбінація ІЛ-8 і CRP створює більш стійку групу біомаркерів, що передбачають наступний розвиток раку легенів (Pine et al., 2011). Активація мутацій KRAS або EGFR є причиною підвищеної експресії ІЛ-8 при НДРЛ; ІЛ-8 надмірно експресується у випадках НДРЛ у чоловіків, курців, пацієнтів похилого віку, НДРЛ із залученням плеври та аденокарцином з мутаціями KRAS; та ІЛ-8 відіграє певну роль у рості та міграції клітин у випадках НДРЛ з активацією мутацій KRAS (Sunaga et al., 2012).

#### Піримідинергічний P2Y-рецептор, G-білок-асоційований, член 6 (P2RY6)

P2RY6 належить до сімейства рецепторів, асоційованих з G-білками. Це сімейство включає декілька підтипів рецепторів із різною фармакологічною селективністю, які інколи перекриваються, до різних аденозин- і уридиннуклеотидів. Підтип P2Y6 експресується на особливу високому рівні у плаценті, що дозволяє припустити його важливу роль для функції плаценти. Однак клітинна локалізація P2Y6 власне у плаценті невідома. P2Y6 може відігравати важливу роль у розвитку, диференціації трофобластів і у трофобластичній неоплазії (Somers et al., 1999). Була продемонстрована важлива роль піримідин-активованого P2Y-рецептора у запальній відповіді епітелію легенів (Schafer et al., 2003).

#### Домени HECT, UBA і WWE, що містять член 1, E3 убіквітин-протеїнілазу (HUWE1)

HUWE1 кодує члена сімейства HECT E3 убіквітинових лігаз. Домен HECT лежить на С-кінці і містить в активному центрі цистеїн, який утворює проміжний убіквітин-тіоестерний зв'язок.

ARF-BP1 (HUWE1) є критичним медіатором як p53-незалежної, так і p53-залежної пригнічуючої ріст пухлини функції ARF. Як такий, ARF-BP1 може служити потенційною мішенню для терапевтичного втручання у випадку пухлин, незалежно від статусу p53 (Chen et al., 2005a). Інактивація ARF-BP1 стабілізує p53 та викликає апоптоз (Chen et al., 2006). HUWE1 (HectH9) надмірно експресується у багатьох типах пухлин людини і є суттєвим чинником для проліферації субпопуляції пухлинних клітин (Adhikary et al., 2005; Zhang et al., 2011a). У разі раку молочної залози HUWE1 значуще корелює з відповідними прогностичними факторами і з кінцевим клінічним результатом (Confalonieri et al., 2009).

#### Версикан (VCAN)

VCAN є членом сімейства протеогліканів, що складається з агрекану і версикану. Відомо, що VCAN асоціюється з рядом молекул позаклітинного матриксу, включаючи гіалуронан, тенасцин, фібулін-1, фібронектин, CD44 і L-селектин, фібрилін, інтегрин і зв'язувальний білок (Zheng et al., 2004). VCAN експресується у багатьох видах тканин. Він надмірно експресується на ранніх стадіях розвитку тканини, та його експресія зменшується після визрівання клітин тканини. Його експресія є також підвищеною під час загоєння ран і росту пухлин (Ghosh et al., 2010). Нокдаун VCAN у клітинах аденокарциноми легенів людини (A549) інтерференцією РНК значно інгібує ріст пухлини *in vivo*, але не *in vitro* (Creighton et al., 2005). VCAN є безпосередньою мішенню для p53. Висока експресія VCAN була виявлена у навколопухлинних тканинах строми на ранніх

стадіях раку передміхурової залози і раку молочної залози, і вона пов'язана з агресивною поведінкою пухлини (Yoon et al., 2002).

Drosha, рибонуклеаза типу III (DROSHA)

Drosha є ферментом РНазою III класу 2, що запускає процесинг молекул мікроРНК (міРНК) або коротких молекул РНК, що природно експресуються клітиною, який регулює велику кількість інших генів шляхом взаємодії з РНК-індукованим сайлесинг-комплексом (RISC) з метою викликати розщеплення комплементарної матричної РНК (мРНК) як частини шляху інтерференційної РНК (іРНК). Молекула мікроРНК синтезується як довгий первинний транскрипт РНК, відомий як первинна мікроРНК (pri-miRNA), яка розщеплюється за допомогою Drosha з утворенням характерної структури типу стебло-петля довжиною приблизно 70 пар основ, відомої як попередник мікроРНК (pre-miРНК) (Lee et al., 2003). Drosha існує у вигляді частини білкового комплексу, що має назву мікропроцесорного комплексу, який також містить білок Pasha (відомий також під назвою DGCR8), що зв'язує дволанцюгову РНК (Denli et al., 2004), що є необхідним для функціонування Drosha, і який є здатним зв'язувати одноланцюгові фрагменти pri-miРНК, необхідні для належного процесингу (Han et al., 2006). Drosha людини був клонований у 2000 р., коли його ідентифікували як ядерну dsРНК рибонуклеазу, що бере участь у процесингу попередників рибосомальної РНК (Wu et al., 2000). Drosha був першим ферментом РНазою III людини, який ідентифікували і клонували. Двома іншими ферментами людини, що беруть участь у процесингу і роботі miРНК, є білки Dicer і Argonaute. Як Drosha, так і Pasha локалізовані у ядрах клітин, де відбувається процесинг pri-miРНК до pre-miРНК. Остання молекула потім перероблюється ферментом РНазою Dicer у зрілі miРНК у клітинній цитоплазмі (Lee et al., 2003). Drosha та інші ферменти, які забезпечують процесинг miРНК, можуть виявитися важливими для прогнозу перебігу раку (Slack and Weidhaas, 2008).

Домен, гомологічний плекстрину, член 8 (PLEKHA8) сімейства А (фосфоінозитид-зв'язувальні специфічні)

Цей ген для фосфатидилінозитол-4-фосфат-адаптора-2 (FAPP2=PLEKHA8) кодує ліпідтрансферазу цитоплазми з доменом, гомологічним плекстрину, що бере участь у визріванні везикул та їх транспорті із транс-Гольджі-мережі до плазматичних мембран (Cao et al., 2009). Введення рибозимів, що націлені на ген FAPP2 у клітинах карциноми товстої кишки, призводило до їх апоптозу у присутності антитіл-агоністів Fas. Клітини гліоми та пухлин молочної залози, трансфековані miРНК FAPP2, також продемонстрували значне підсилення апоптозу (Tritz et al., 2009). Проведені пізніше дослідження дозволили зробити акцент на ролі FAPP2 як білка-переносника ліпідів, що бере участь у метаболізмі глікосфінголіпідів у комплексі Гольджі (D'Angelo et al., 2012). Адаптерний білок 2 (FAPP2), що переносить фосфоінозитол-4-фосфат, відіграє ключову роль у продукції глікосфінголіпідів (GSL), з використанням його домену на С-кінці для транспорту щойно синтезованого глюкозилцераміду для віддалення від зверненої до цитозолу глюкозилцерамідсинтази цис-Гольджі-мережі для подальшого процесингу за анаболічним шляхом (Kamlekar et al., 2013).

Ацетил-КоА-карбоксилаза альфа (ACACA)

ACACA є біотин-вмісний фермент, що каталізує карбоксилювання ацетилю-КоА до малонілу-КоА, швидкість-визначальну стадію процесу синтезу жирних кислот (Tong and Harwood, Jr., 2006). Позитивна регуляція ACACA була знайдена при багатьох видах ракових захворювань, вона сприяє тому, щоб ліпогенез задовольняв потребу ракових клітин у швидкому рості і проліферації. Таким чином, може бути ефективним використовувати ACACA як перспективну мішень для втручання у перебіг раку, а інгібітори, розроблені для лікування хвороб обміну речовин, можливо використовувати як потенційні терапевтичні засоби для терапії раку (Wang et al., 2010a). У двох дослідженнях було показано, що сайленсинг ACACA інтерференцією РНК спричиняє інгібування росту і клітинну смерть майже у тій самій мірі, що спостерігалася після сайленсингу гену FAPP2 (Brusselmans et al., 2005; Chajes et al., 2006). TOFA (5-тетрадецилокси-2-фуранкарбонова кислота), алостеричний інгібітор ACACA, характеризуються цитотоксичними властивостями по відношенню до клітин раку легенів NCI-H460 і клітин карциноми товстої кишки HCT-8 і HCT-15 та індукує апоптоз (Wang et al., 2009a). Інший високо потужний інгібітор ACACA, сорофен А, блокує ліпогенез і стимулює окиснення жирних кислот у клітинах раку передміхурової залози. Ракові клітини перестають проліферувати і кінець кінцем гинуть (Beckers et al., 2007). Ці факти означають, що окрім накопичення малоніл-СоА, інгібування ліпогенезу само по собі викликає загибель ракових клітин, і що ACACA кінець кінцем може служити мішенню протипухлинної терапії (Brusselmans et al., 2005).

Інтегрин, альфа 11 (ITGA11)

Інтегрини відіграють визначальну роль у різних клітинних процесах і процесах розвитку, включаючи ріст клітин, диференціацію та виживання, а також канцерогенез, інвазію ракових

клітин і утворення метастазів. Інтегрин альфа11 (ITGA11, альфа11) локалізується у фібробластах строми і звичайно надмірно експресується у недрібноклітинній карциномі легенів (НДРЛ). мРНК інтегрину альфа11 надмірно експресована як у аденокарциномі легенів, так і у плоскоклітинній карциномі (Wang et al., 2002). Доповідалося, що альфа11 відіграє важливу роль у здатності фібробластів стимулювати ріст клітин НДРЛ *in vivo*, і така активність частково опосередкована його участю в регуляції експресії IGF2 (Zhu et al., 2007). Що стосується параметрів клінічної патології пацієнтів з НДРЛ, надекспресія hMTH1, SPD, HABP 2, ITGA11, COL11A1 і CK-19 значуще корелює зі стадією розвитку патології ( $p < 0,05$ ). Крім цього, надмірна експресія hMTH1, SPD, ITGA11 і COL11A1 корелювала з метастазами у лімфатичні вузли і несприятливим прогнозом (Chong et al., 2006).

Колаген типу XII, альфа-1 (COL12A1)

Ген COL12A1 кодує альфа-ланцюг колагену типу XII, члена сімейства колагенів FACIT (фібрил-асоційованих колагенів із розривами у потрібній спіралі). 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 (Oh et al., 1992). COL12A1 може брати участь у регуляції базальних мембран, забезпечуючи утворення особливих молекулярних містків між фібрилами та іншими компонентами матриксу (Thierry et al., 2004). COL12A1 експресується у серці, плаценті, легенях, м'язах скелету і підшлункові залозі (Dharmavaram et al., 1998), у багатьох сполучних тканинах, включаючи суглобові і епіфізарні хрящі (Gregory et al., 2001; Walchli et al., 1994; Watt et al., 1992). Експресія COL12A1 була зниженою у пухлинах із високою мікросателітною нестабільністю у порівнянні зі стабільною групою з низькою мікросателітною нестабільністю або з її відсутністю (Ortega et al., 2010).

Еластаза, що експресується нейтрофілами (ELANE)

Нейтрофільна еластаза (або лейкоцитарна еластаза), відома також як ELA2 (еластаза 2, нейтрофільна) є сериною протеїназою того ж сімейства, що хімотрипсин, і має широку субстратну специфічність. Секретована нейтрофілами під час запалення, вона руйнує бактерії і тканини хазяїна (Belaouaj et al., 2000). Нещодавно виявили, що еластаза нейтрофілів людини (ELANE), яка відіграє головну роль у розвитку хронічних обструктивних захворювань легенів, має також відношення до прогресування недрібноклітинного раку легенів. Вона може діяти на декількох рівнях: (i) на внутрішньоклітинному, видаляючи, наприклад, адапторні молекули субстратів інсулінового рецептора-1 (IRS-1), (ii) на поверхні клітин, гідролізуючи такі рецептори як CD40, (iii) у позаклітинному оточенні, генеруючи фрагменти еластину, тобто морфоеластокіни, які активно стимулюють інвазивність ракових клітин і ангиогенез (Mogoy et al., 2012). Нейтрофільна еластаза безпосередньо стимулює проліферацію пухлинних клітин аденокарцином легенів як людини, так і мишей, за рахунок отримання доступу до ендосомального компартменту всередині пухлинних клітин, де вона розкладає субстрат інсулінового рецептора-1 (IRS-1) (Houghton et al., 2010).

Інгібітор серпінпептидази, класу В (овальбумін), член 3 (SERPINB3)

Антиген плоскоклітинної карциноми (SCCA), що також має назву SERPINB3, є членом сімейства високомолекулярних речовин, інгібіторів серинпротеази (серпінів) (Suminami et al., 1991). Доповідалося про його високі рівні у тканинах ракових пухлин голови та шиї та інших видів епітеліального раку (Torre, 1998). Доповідалося, що SCCA надмірно експресується у пухлинній тканині у порівнянні з навколорухлинними тканинами, що означає перспективність його використання як маркера для гістологічного виявлення ГЦК (Pontisso et al., 2004). Очевидно, що серпіни B3/B4, особливо серпін B4, відіграють важливу роль у абераційній проліферації епітелію. Визначення серпінів B3/B4 може мати прогностичну цінність у передбаченні прогресування хвороби, особливо у пацієнтів з підвищеною схильністю до раку легенів (Calabrese et al., 2012). З одного боку, SCCA1 (SERPINB3) інгібує клітинну смерть, яку викликають лізосомні хвороби, а з другого боку, він сенситивізує стрес клітин ER, активуючи каспазу-8 незалежно від апоптозного шляху за участі рецепторів загибелі клітини (Ullman et al., 2011). Деякі факти свідчать про те, що SERPINB3 відіграє важливу роль у індукції порушення епідермального бар'єру. SERPINB3 може бути критичним вирішальним фактором бар'єрної функції епідермісу (Katagiri et al., 2010).

Член сімейства кінезинів 26B (KIF26B)

Кінезин - це білок, що належить до класу моторних, він виявлений у клітинах еукаріотів. Кінезини рухаються вздовж філаментів мікротрубочок і приводяться в рух за допомогою гідролізу АТФ (таким чином, кінезини є АТФазами). Kif26b, ген сімейства кінезинів, є низхідною мішенню Sall1 (Nishinakamura et al., 2011). Kif26b є важливим для розвитку нирок, оскільки він регулює адгезію мезенхімальних клітин у контакті з зачатками сечовода. Надекспресія Kif26b *in*



*vitro* спричиняє підвищену адгезію клітин за рахунок взаємодій з нем'язовим міозином (Terabayashi et al., 2012; Uchiyama et al., 2010).

Анкілоз, прогресивний гомолог (мишачий) (ANKH)

ANKH (гомолог білка прогресуючого анкілозу людини) регулює транспорт неорганічного пірофосфату (PPi) через клітинну мембрану (Wang et al., 2008a). Деякі дані вказують на те, що експресія ANKH та його функціональна активність *in vitro* та *in vivo* пригнічуються гіпоксичним оточенням і що цей ефект регулюється HIF-1 (Zaka et al., 2009). Ген ANKH людини експресується *in vivo* у тканиноспецифічний спосіб, до того ж найвищі рівні експресії мРНК виявлені у головному мозку, серці та скелетних м'язах (Guo et al., 2001). Мутації у гені ANKH були пов'язані з аутосомно-домінантною краніометафізарною дисплазією (Kornak et al., 2010). Експресія ANKH значно підвищується в клітинних лініях раку шийки матки з ампліфікацією у порівнянні з клітинними лініями без ампліфікації (Kloth et al., 2007). Геномна ампліфікація ділянок хромосоми агт 5p часто спостерігалася при дрібноклітинному раку легенів (ДРЛ), що наводить на думку про присутність багатьох онкогенів на цій структурній ланці. Сое та співавт. описали ідентифікацію мікрodelецій, які не вдавалося виявити під час традиційного скринінгу, і ідентифікацію TRIO і ANKH як нових передбачуваних онкогенів (Сое et al., 2005)

Фактор ядерного експорту РНК 1 (NXF1)

У клітинах людини фактор експорту мРНК NXF1 знаходиться у нуклеоплазмі і в комплексах ядерних пор (Zhang et al., 2011b). Транспорт мРНК із сайту транскрипції у ядрі до сайту трансляції у цитоплазмі є суттєвим процесом експресії генів еукаріот. У тканинах людини фактор експорту мРНК NXF1 (також відомий як TAP) супроводжує транскрипти мРНК із ядра за рахунок одночасного зв'язування мРНК, адаптерних білків мРНК і фенілаланін-гліцинових (FG) повторів комплексів ядерних пор (Kelly and Corbett, 2009). NXF1 є унікальним серед факторів ядерного транспорту, оскільки він є мультидоменним білком, що не має структурної або механістичної схожості з білками типу каріоферин, які транспортують білковий вантаж, тРНК і мікроРНК через КЯП. Експорт мРНК за допомогою NXF1 відбувається незалежно від ГТФаз Рап (Gruter et al., 1998). Експорт мРНК із ядер опосередкований транспортними факторами, такими як NXF1, що зв'язує мРНК і є посередником їх транслокації через центральний канал ядерних пор (КЯП), з використанням короткочасних взаємодій із FG-нуклеопоринами (Wickramasinghe et al., 2010). мРНК можуть бути транспортовані або експортом гуртом з використанням шляху NXF1/TAP, або більш спеціалізованими шляхами з використанням білка збереження ділянки хромосоми 1 (CRM1) (Siddiqui and Borden, 2012).

Регулятор передачі сигналу G-білок 4 (RGS4)

RGS4 діє як білок, що прискорює дію ГТФаз з метою модулювання передачі сигналу від  $\mu$ - і  $\delta$ -опіоїдних рецепторів (MOR і DOR відповідно). Зниження активності RGS4 під дією опіоїдного агоніста відбувається з використанням убіквітин-протеасомного шляху. Воно може зробити свій внесок у підтримання клітинного гомеостазу у стані залежності від морфіну (Wang and Traynor, 2011). RGS4 відіграє важливу роль у регулюванні функції бета-клітин (Ruiz, I et al., 2010). Xie і співавт. запропонували використовувати RGS4 як нового супресора стадій міграції та інвазії раку молочної залози, важливих стадій метастатичних каскадів (Xie et al., 2009). RGS4 надмірно експресується у карциномі щитоподібної залози. Ефективне інгібування його експресії у клітинах карциноми щитоподібної залози значно знижує життєздатність клітин карциноми щитоподібної залози, що свідчить про важливу роль RGS4 у канцерогенезі пухлин щитоподібної залози (Nikolova et al., 2008). RGS4 диференційно експресується у клітинних лініях пухлин підшлункової залози людини і, як було з'ясовано, є потенційним геном-маркером локальної інвазії пухлин і метастазування у печінку при карциномах підшлункової залози (Niedergethmann et al., 2007). Надекспресія RGS4 спричиняє відтерміновану і змінену тубуляцію епітеліальних клітин легенів за рахунок селективного інгібування опосередкованої C-білком активації МАПК p38 і, в результаті, за рахунок зменшення проліферації епітеліальних клітин, міграції, а також експресії ендотеліального фактора росту судин (VEGF) (Albig and Schiemann, 2005).

Глютамін-фруктозо-6-фосфаттрансаміназа 2 (GFPT2)

GFPT2 бере участь у рості аксонів, ранніх стадіях розвитку нейронів, нейропептидний сигнальний трансдукції/синтезі нейропептидів та у нейрональних рецепторах (Tondreau et al., 2008). Генні варіанти GFPT2 асоціюються з цукровим діабетом типу 2 та діабетичною нефропатією (Zhang et al., 2004). Крім цього, асоціація SNP і GFPT2 свідчить, що ген, який бере участь у модуляції окислювального шляху, може бути головною причиною діабетичної хронічної ниркової недостатності (Prasad et al., 2010). Метилювання ДНК гена GFPT2 було підтверджене у зразках первинної гострої лімфобластної лейкемії (ГПЛ). У пацієнтів з метилюванням багатьох CpG-мотивів спостерігалась гірша загальна виживаність (Kuang et al., 2008). GFPT2 відіграє певну роль у метаболізмі глютаміну, і спостерігається більш висока його експресія в лініях

мезенхімальних клітин. Метаболізм глютаміну може відігравати важливу роль у прогресуванні пухлин, і можливо, що інгібітори шляхів клітинного метаболізму стануть засобами епігенетичної терапії (Simpson et al., 2012).

Молекула клітинної адгезії ендотелію головного мозку (CERCAM)

CERCAM локалізовані на поверхні ендотеліальних клітин (Starzyk et al., 2000) і картовані в локусі 9q34.11 хромосоми, ділянка на 9q, ідентифікована як кандидат на джерело виникнення сімейного ідіопатичного сколіозу (Miller et al., 2012). Ген CEECAM1 активно транскрибується у нервовій системі і у декількох секреторних тканинах, таких як слинні залози, підшлункова залоза, печінка і плацента (Schegg et al., 2009). Білок CERCAM структурно подібний до ферментів GLT25D1 і GLT25D2 групи ColGalT. Але, хоча його функціональне призначення досі невідоме, він видається функціонально відмінним від спорідненого білка GLT25D1, і цей білок не є глікозилтрансферазою, як білки GLT25D1 і GLT25D2 (Perrin-Tricaud et al., 2011).

УДФ-N-ацетил-альфа-D-галактозамін: поліпептид N-ацетилгалактозамінілтрансфераза 2 (GalNAc-T2) (GALNT2)

GALNT2 каталізують першу стадію муцин-тип O-глікозилювання пептидів у апараті Гольджі. Ці ферменти переносять N-ацетилгалактозамін (GalNAc) від УДФ-GalNAc до гідроксильної групи серину або треоніну в білках-мішенях (Peng et al., 2010). Знайдено, що GALNT2 конститутивно експресується на низьких рівнях у більшості або в усіх клітинних лініях аденокарцином людини із підшлункової залози, товстої кишки, шлунка і молочної залози (Sutherlin et al., 1997). Дослідження показали, що O-глікани і гени GALNT відіграють ключову роль у багатьох біологічних функціях і розвитку захворювань у людини. Ризик захворювання на епітеліальний рак яєчника (Terry et al., 2010) і на хворобу коронарних артерій (Willer et al., 2008) пов'язаний з одонуклеотидним поліморфізмом GALNT2. Аберантне глікозилювання глікопротеїнів клітинної поверхні завдяки специфічним змінам у активності глікозилтрансферази звичайно пов'язане з інвазією та розвитком метастазів раку. GALNT2 бере участь у міграції пухлини ті її інвазії у випадку карцином шлунка (Hua et al., 2012), гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) (Wu et al., 2011b) і злоякісних гліом людини (Liu et al., 2011a).

Гетерогенний ядерний рибонуклеопротеїн M (HNRNPM)

Ген HNRNPM належить до підсімейства повсюдно експресованих гетерогенних ядерних рибонуклеопротеїнів (гЯРНП). HNRNPM є поширеним компонентом комплексів гЯРНП людини, які можуть впливати на сплайсинг пре-мРНК шляхом регуляції сплайсингу її особистої пре-мРНК (Hase et al., 2006) або шляхом дії на регуляцію альтернативного сплайсингу рецептора фактора росту фібробластів 2 (Hovhannisyan and Carstens, 2007). Протеомний аналіз очищених *in vitro* сплайсосом виявив HNRNPM у пре-сплайсосомному H-комплексі і по всій структурі сплайсосоми (Rappsilber et al., 2002; Wahl et al., 2009). HNRNPM бере участь у механізмі сплайсингу через його взаємодію зі сплайсосомним субкомплексом CDC5L/PLRG1 (Lleres et al., 2010). Деякі результати демонструють, що у ракових клітинах людини утримання IMP-3 і HNRNPM у цитоплазмі приводить до значного падіння проліферації. Ядерний комплекс MP-3-HNRNPM є важливим для ефективного синтезу CCND1, D3 і G1 та для проліферації ракових клітин людини (Rivera et al., 2013).

Базонуклін 1 (BNC1)

Базонуклін є білком, що містить домен типу "zinc finger", із надзвичайно обмеженим розподілом серед тканин (Tseng, 1998). На цей час базонуклін був виявлений головним чином у базальних кератиноцитах багатошарового плоскоклітинного епітелію (шкіра, епітелій порожнини рота, стравохід, піхва і рогівка) і в гаметогенних клітинах яєчок та яєчників (Tseng and Green, 1994; Weiner and Green, 1998). Зараз існує достатньо доказів, що базонуклін є фактором транскрипції генів рРНК (рДНК), специфічним до типу клітин. Домени "цинкові пальці" базонукліну взаємодіють з трьома еволюційно консервативними сайтами всередині промотору рДНК (Iuchi and Green, 1999; Tseng et al., 1999). Епігенетична регуляція метилуванням CpG відіграє важливу роль у онкогенезі, а також у відповіді на протиракову терапію. BNC1 був підданий гіпометилуванню у стійких до дії опромінення лініях клітин H1299 недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ) людини. Пригнічення експресії клітин H1299 під дією мРНК каналів BNC1 також знижувало стійкість цих клітин до дії іонізуючого випромінювання (Kim et al., 2010a). Аберантне метилування ДНК гену BNC1 було також виявлене у зразках хворих на хронічний лімфолейкоз (CLL) (Tong et al., 2010). При нирково-клітинній карциномі (RCC) метилування BNC1 було асоційоване з більш несприятливим прогнозом незалежно від розміру пухлини, стадії або ступеню злоякісності (Morris et al., 2010).

FK506-зв'язувальний білок 10, 65 кДа (FKBP10)

FK506-зв'язувальний білок 10 (FKBP10) належить до сімейства пептидил-проліл-цис/транс-ізомераз FKBP-типу. Його виділяють із ендоплазматичного ретикулума, і він діє як

молекулярний шаперон (Ishikawa et al., 2008; Patterson et al., 2000). Він надмірно експресується під час розвитку легенів, і після уражень легенів його можна реактивувати у координаційний спосіб білками позаклітинного матриксу (Patterson et al., 2005).

Білок 1 сімейства рецепторів, що завиваються (FZD1), білок 2 сімейства рецепторів, що завиваються (FZD2), білок 7 сімейства рецепторів, що завиваються (FZD7)

Усі гени FZD2, FZD1 і FZD7 належать до сімейства генів "що завиваються". Члени цього сімейства генів кодуєть білки 7-трансмембранного домену, які є рецепторами для білків сигнального шляху Wnt.

Очевидно, що експресія гену FZD2 активується у процесі розвитку, з високими рівнями експресії у нирках і легенях плоду і товстій кишці і яєчниках дорослих (Sagara et al., 1998; Zhao et al., 1995).

Білок FZD1 містить сигнальний пептид, зі збагаченими цистеїном доменами у N-термінальній ділянці позаклітинного простору, 7 трансмембранних доменів і C-термінальний PDZ-домен-зв'язувальний мотив. FZD1-транскрипт експресується у різних тканинах, включаючи легені, а також серце, нирки, підшлункову залозу, передміхурову залозу і яєчники (Sagara et al., 1998). Було знайдено, що рецептори, "що завиваються", 1 і 2 надмірно експресуються при раку молочної залози (Milovanovic et al., 2004).

Білок FZD7 містить N-термінальну сигнальну послідовність, 10 залишків цистеїну, що типово для збагаченого цистеїном позаклітинного домена членів сімейства Fz, 7 передбачуваних трансмембранних доменів і внутрішньоклітинний C-термінальний хвіст з PDZ-домен-зв'язувальним мотивом. Експресія гену FZD7 може пригнічувати функціональну активність АПК і підсилювати сигнали, що передаються за допомогою бета-катеніну, у слабо диференційованих карциномах стравоходу (Sagara et al., 1998; Tanaka et al., 1998).

АТФаза, що переносить  $\text{Ca}^{++}$ , м'яза міокарда, волокна швидкого типу 1 (ATP2A1), АТФаза, що переносить  $\text{Ca}^{++}$ , м'яза міокарда, волокна швидкого типу 2 (ATP2A2)

Обидва гени (ATP2A1 і ATP2A2) кодуєть  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази SERCA-типу. Кальцієві АТФази (SERCA) саркоплазматичного ретикулуму (SR)/ER є кальцієвими насосами, у яких поєднується гідроліз АТФ із кальцієвим транспортом крізь мембрану SR/ER (MacLennan et al., 1997). SERCA кодуєть трьома гомологічними генами: SERCA1 (ATP2A1), SERCA2 (ATP2A2) і SERCA3 (Wu et al., 1995). З'явилися деякі докази, які свідчать про те, що SERCA можуть також безпосередньо впливати на процеси апоптозу, диференціації і проліферації клітин (Chami et al., 2000; Ma et al., 1999; Sakuntabhai et al., 1999).

Мутації в ATP2A1, що кодує SERCA1, викликають деякі аутосомно-рецесивні форми хвороби Броді, для якої характерне підвищене пошкодження м'язової релаксації під час фізичних вправ (Odermatt et al., 1996).

ATP2A2 є АТФазою, пов'язаною з хворобою Дар'є, рідкісним аутосомно-домінантним спадковим захворюванням шкіри, для якого характерна патологічна кератинізація і акантоліз (Huo et al., 2010). Зміни у гені ATP2A2 можуть бути причиною схильності до раку легенів і товстої кишки, а пошкоджений ген ATP2A2 може відігравати певну роль у канцерогенезі (Korosec et al., 2006). У клітинних лініях дрібноклітинного раку легенів (H1339) і аденокарциноми легенів (HCC) вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у ендоплазматичному ретикулумі (ER) знижується у порівнянні з нормальним епітелієм бронхів людини. Зменшений вміст  $\text{Ca}^{2+}$  корелює зі зниженою експресією SERCA 2, що накачує кальцій у ER (Bergner et al., 2009). ATP2A2 може бути потенційним прогностичним маркером для пацієнтів, хворих на колоректальний рак КРК. Його виявили у циркулюючих пухлинних клітинах (ЦПК), і післяопераційний рецидив значуще корелював із підвищеною експресією цього гена (Huang et al., 2012).

Ламінін, гамма 2 (LAMC2)

Ламініни, сімейство позаклітинних матричних глікопротеїнів, Ламініни є головними неколагенними компонентами базальних мембран. Вони причетні до широкого спектру біологічних процесів, включаючи адгезію клітин, їх диференціацію, міграцію, передачу сигналів, ріст аксонів і розвиток метастазів. Ген LAMC2 кодує  $\gamma$ 2-ланцюг ламініну-5, який є частиною ламініну-5, одного з головних компонентів зони базальної мембрани. Часто спостерігається позитивна регуляція LAMC2 під дією промотора деметилування при раку шлунка (Kwon et al., 2011). Було виявлено надмірну експресію LAMC2 у ангіотропних зонах меланоми порівняно з аваскулярними зонами меланоми (Lugassy et al., 2009). LAMC2 є маркером метастазів раку сечового міхура, і рівень його експресії пов'язаний із ступенем злоякісності раку (Smith et al., 2009b). Гени LAMB3 і LAMC2 коекспресувалися у 21 із 32 клітинних ліній НДРЛ (66 %), але лише в одній із 13 клітинних ліній ДРЛ (8 %). Коекспресія генів LAMB3 і LAMC2 також спостерігалася в усіх чотирьох випадках досліджених клітин первинного НДРЛ, але не в відповідних неракових клітинах легенів (Manda et al., 2000).

Білок теплового шоку 2, 70 кДа (HSPA2), білок теплового шоку 8, 70 кДа (HSPA8)

HSPA2 був ідентифікований як потенційний онкогенний білок, що експресується на аномальному рівні у підгрупі ракових захворювань людини, таких як рак молочної залози (Mestiri et al., 2001), рак шийки матки (Garg et al., 2010a), уротеліальний рак сечового міхура (Garg et al., 2010b), назофарингеальна карцинома (Jalbout et al., 2003) і злоякісні пухлини (Chouchane et al., 1997). Деякий рівень активності гену HSPA2 спостерігався також у лініях клітин, виділених із пухлин декількох типів раку людини (Scieglinska et al., 2008), у той час як сайленсинг гену HSPA2 у ракових клітинах приводив до затримки їх росту і зменшення онкогенного потенціалу (Rohde et al., 2005; Xia et al., 2008). Крім цього, поліморфізм гену HSPA2 асоціюється з підвищенням ризику розвитку раку легенів (Wang et al., 2010b). Надекспресія HSPA2 корелює з підвищенням проліферації клітин, низьким ступенем диференціювання і метастазами у лімфатичні вузли при раку молочної залози людини, раку шийки матки і уротеліальному раку сечового міхура (Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b; Mestiri et al., 2001).

Ген HSPA8 кодує білок Hsc70 члена сімейства білків теплового шоку 70, який містить як індукований теплом член, так і член, що експресується конститутивно. HSPA8 зв'язується з поліпептидами, що ростуть, для сприяння правильному фолдингу білків (Beckmann et al., 1990). Hsc70 виконує функції молекулярних шаперонів, сприяючи синтезу, фолдингу, збірці, транспорту між компартментами клітини і розщепленню білків (Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Hsc70 експресується у незлоякісних клітинах ссавців, а також у клітинах раку молочної залози (Kao et al., 2003; Vargas-Roig et al., 1998), і надекспресія Hsp/hsc70 у хіміорезистентних ракових клітинах (Ciocca et al., 1992; Lazaris et al., 1997) стимулювала проведення досліджень цих білків як потенційних клінічних маркерів (Ciocca and Calderwood, 2005). Саме ця можлива роль цього секретованого шаперону hsc70 у проліферації клітин може пояснити більший ріст пухлини, що складається з ракових клітин, що надмірно експресують катепсин D (Nirde et al., 2010). Крім цього, Ruisin і співавт. сповістили про взаємозв'язок між поліморфізмом цього гену і ризиком захворювання на рак легенів (Rusin et al., 2004).

Вакуолярний білок, що сортує, 13 гомолог В (дріжджі) (VPS13B)

VPS13B був ідентифікований як периферичний мембранний білок, локалізований у комплексу Гольджі, де він накладається на матричний білок GM130 цис-Гольджі-мережі. Із субклітинною локалізацією узгоджується той факт, що виснаження VPS13B під дією іРНК приводить до фрагментації комплексу Гольджі до міні-купок (Seifert et al., 2011). Kolehmainen і співавт. (2003) ідентифікували ген COH1, відомий також як VPS13B, в межах критичної ділянки хромосоми 8q22, з якою асоціюють синдром Коена (Kolehmainen et al., 2003). Мутації з втратою функції у гені VPS13B призводять до аутосомно-рецесивного синдрому Коена (Seifert et al., 2011). Мутації VPS13B та інших генів були описані для захворювань на рак шлунка і колоректальний рак із мікросателітною нестабільністю (An et al., 2012).

Білок, подібний до продукту 1 гену CSE1, який контролює сегрегацію хромосом (дріжджі) (CSE1L)

Було показано, що ген схильності до клітинного апоптозу (CSE1L) регулює декілька клітинних механізмів, включаючи контрольну точку мітотичного веретена поділу, а також проліферацію і апоптоз. CSE1L локалізований як у цитоплазмі, так і у ядрах клітин. Ядерний CSE1L регулює транскрипційну активність білка p53, головного білка-супресора пухлинного росту (Rao et al., 2011; Tanaka et al., 2007). Цитоплазматичний CSE1L пов'язаний із мікротрубочками, і було показано, що цей зв'язок є причиною стимуляції інвадоподій і підсилення міграції пухлинних клітин (Tai et al., 2010). Висока ступінь експресії CSE1L спостерігається у більшості типів раку, таких як доброякісні і злоякісні меланоцитарні новоутворення шкіри (Bonì et al., 1999), карцинома ендометрію (Peiro et al., 2001), карцинома яєчників (Brustmann, 2004), рак молочної залози (Behrens et al., 2001), уротеліальна карцинома сечового міхура (Chang et al., 2012), і було показано, що його експресія корелює з прогресуванням раку. Сайленсинг CSE1L може виявитися потенційним терапевтичним підходом до лікування раку товстої кишки (Zhu et al., 2013).

Дигідропротіамідиназа-подібний 4 (DPYSL4)

Споріднений дигідропротіамідиназі білок 4 (DPYSL4) є відомим як регулятор розвитку нейронів гіпокампу. DPYSL4 бере участь у регуляції росту, поляризації і дифереціації клітин зубного епітелію у процесі морфогенезу зачатка зуба (Yasukawa et al., 2013). У деяких дослідженнях показано, що DPYSL4 відіграє роль у сповільненні росту аксонів, очевидно, за рахунок інгібування полімеризації мікротрубочок, а також вперше виявлений взаємозв'язок з віментином під час ядерної конденсації перед загибеллю нейронів (Aylsworth et al., 2009). p53, ген-супресор пухлинного росту, який часто є мутованим у широкому спектрі пухлин, відіграє важливу роль у підтриманні цілісності геному. Експресія фактором DPYSL4 як мРНК, так і білка

специфічно індукувалися протипухлинними препаратами у р53-профіцитних клітинах. DPYSL4 є фактором, що індукує апоптоз, який контролюється р53 у відповідь на пошкодження ДНК (Kimura et al., 2011).

#### Гама-субодиниця Sec61 (SEC61G)

SEC61γ, компонент гетеротримерного білкового каналу, що включає субодиниці SEC61α, β і γ, є членом транслокону SEC61 (Greenfield and High, 1999). Комплекс SEC61 утворює трансмембранну пору для транслокації поліпептидів, що ростуть, у порожнину ER, а також для інтеграції трансмембранних білків у ліпідний бішар ER (Osborne et al., 2005). SEC61γ є необхідним для виживання пухлинних клітин і для клітинної відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулуму. Крім цього, він надзвичайно високо експресується у злоякісних клітинах і майже відсутній у здорових клітинах (Lu et al., 2009). Здійснення інактивації експресії SEC61γ приводило до апоптозу і деактивації сигналу для виживання EGFR/AKT (Lu et al., 2009), а також до інгібування росту пухлинних клітин (Neidert et al., 2012).

#### ORM1-подібний 1 (*S. cerevisiae*) (ORMDL1)

Гени людини (ORMDL1, ORMDL2 і ORMDL3) експресуються у всіх тканинах дорослого організму та плоду. Вони кодують трансмембранні білки, закорені у ендоплазматичному ретикулумі, які, як вважають, беруть участь у фолдингу білків у ER. За допомогою аналізу геномних послідовностей Hjelmqvist і співавт. (2002) картували ген ORMDL1 в локусі 2q32.2 хромосоми (Hjelmqvist et al., 2002). Білки ORMDL є головними регуляторами біосинтезу керамідів у клітинах ссавців (Siow and Wattenberg, 2012). Експресія ORMDL1 специфічно знижується у випадку мутацій у презаніліні 1 (PS1) (Araki et al., 2008).

#### Пеканекс-подібний 3 (*Drosophila*) (PCNXL3)

Пеканекс-подібний білок 3 (PCNXL3) є білком, що проходить крізь мембрану декілька разів. Він належить до сімейства пеканексів.

Ген PCNXL3 картували на ділянці хромосоми 11q12.1-q13. Три нових пухлино-асоційованих точки розриву для транслокацій, були розташовані на ділянці хромосоми 11q13 між маркерами D11S4933 і D11S546. Таким чином, PCNXL3, можливо, є асоційованим із хромосомою 11q13 геном, відповідальним за розвиток хвороб (van et al., 2000).

#### Малий ядерний рибонуклеопротеїн 200 кДа (U5) (SNRNP200)

Сплайсинг пре-мРНК каталізується сплайсосомою, комплексом спеціалізованої РНК і субодиниць білка, який видаляє інтрони з транскрибованого сегменту пре-мРНК. Сплайсосома складається з малих ядерних РНК-білків (мяРНП) U1, U2, U4, U5 і U6, разом із приблизно 80 консервативними білками. SNRNP200 є геном, необхідним для розплітання дуплексу U4/U6, стадія, яка є суттєвою для каталітичної активації сплайсосоми (Maeder et al., 2009). Експресію SNRNP200 виявили у серці, головному мозку, плаценті, легенях, печінці, скелетних м'язах, нирках і підшлунковій залозі (Zhao et al., 2009). Нещодавно були відкрито, що мутації в SNRNP200 пов'язані з аутосомно-домінантною пігментною дистрофією сітківки (adRP) (Benaglio et al., 2011; Liu et al., 2012).

#### SAM домен, SH3 домен і сигнали ядерної локалізації 1 (SAMSN1)

SAMSN1 є членом нового сімейства генів, передбачуваних адаптерних і каркасних білків, що містять SH3 і SAM (альфа-спіральний мотив) домени. SAMSN1 експресується в гематопоетичних клітинах, м'язах, серці, головному мозку, легенях, підшлунковій залозі, ендотеліальних клітинах і мієломах. Було показано, що експресія ендегенного SAMSN1 є надмірною у первинних В-клітин після дії стимуляторів, що індукують диференціацію і проліферацію, а дослідження трансдукції вказують на те, що SAMSN1 відіграє роль стимулятора у диференціації В-клітин у плазматичні клітини (Brandt et al., 2010). Лінії клітин і первинні клітини, отримані від пацієнтів із гострою мієлоїдною лейкемією і множинною мієломою, експресують SAMSN1 (Claudio et al., 2001). Експресія SAMSN1 була зниженою у лініях клітин крупноклітинної карциноми легенів Calu-6 (Yamada et al., 2008). SAMSN1 диференційно експресується при раку, асоційованому з виразковим колітом (Watanabe et al., 2011).

#### Перетворювач сигналів і активатор транскрипції 2, 113 кДа (STAT2)

STAT2 є новим джерелом у колоректальному і шкірному канцерогенезі, який може спричиняти підвищення експресії і секреції прозапальних медіаторів, що у свою чергу активує сигнальний шлях за участі онкогенного STAT3 (Gamero et al., 2010). STAT2 є медіатором, критичним для активації апоптозу, індукованого інтерфероном І типу. Що є більш важливим, дефекти експресії або ядерної локалізації STAT2 можуть зменшити ефективність імунотерапії інтерфероном І типу (Romero-Weaver et al., 2010). Більш низька експресія STAT2 в астроцитомах низького ступеню злоякісності була виявлена при порівнянні з астроцитомами високого ступеню злоякісності. Результати показали існуючий зв'язок між STAT і сигнальним

шляхом за участі PPARgamma у гліальних пухлинах і додатково підтвердили очікувану важливу роль факторів STAT у регуляції росту і диференціації цих пухлин (Ehrmann et al., 2008).

Комплекс транскрипції CCR4-NOT, субодиниця 1 (CNOT1)

Деаденілазний комплекс CCR4-NOT складається з принаймні дев'яти ферментних і неферментних субодиниць. CNOT1 відіграє важливу роль у виявленні ферментативної активності комплексу CCR4-NOT, і, таким чином, є критичним фактором у контролі деаденілювання мРНК і розпаду мРНК. Виснаження CNOT1 структурно і функціонально руйнує комплекс CCR4-NOT і стабілізує мРНК, що приводить до приросту у трансляції, що викликає стрес-опосередкований апоптоз у ER. Ito і співавт. дійшли до висновку, що CNOT1 сприяє життєздатності клітин, забезпечуючи активність CCR4-NOT деаденілази (Ito et al., 2011). Опосередковане міРНК виснаження ендогенного CNOT1 або інших субодиниць Ccr4-Not у клітинах раку молочної залози приводить до дерегуляції генів-мішеней ERalpha (підвищеної індукції генів-мішеней ERα - TTF1 і c-Мус). Ці факти визначають, що комплекс Ccr4-Not виконує функцію репресора транскрипції у сигнальному шляху ядерних рецепторів, що відповідає розумінню молекулярних шляхів, пов'язаних із раком (Winkler et al., 2006).

Серин-гідроксиметилтрансфераза 2 (мітохондріальна) (SHMT2)

Ген SHMT2 кодує мітохондріальну форму піридоксальфосфат-залежного ферменту, який каталізує оборотну реакцію серину і тетрагідрофолату з утворенням гліцину і 5,10-метилентетрагідрофолату. Продукт, що кодується, несе головну відповідальність за синтез гліцину. Очікується, що у полігенному захворюванні, яким є рак легенів, взаємодія між генами відіграє важливу роль у визначенні фенотипової варіабельності захворювань. Взаємодії поліморфізмів MTHFR677, MTHFR1298 і SHMT можуть мати значний вплив на генетичну нестабільність пацієнтів, хворих на рак легенів. Було показано, що стосується цитогенетичних змін, що у лімфоцитів пацієнтів, хворих на рак легенів, які піддавались дії специфічного для табака канцерогену 4-(метилнітрозаміно)-1-(3-піридил)-1-бутанону [NNK], спостерігалася значно підвищена частота цитогенетичного пошкодження у присутності MTHFR 677, MTHFR 1298 і алельних варіантів SHMT (Piskac-Collier et al., 2011). Фармакогеномні дослідження ролі поліморфізму гену SHMT у ефективності протоколів із 5-FU і FOLFIRI для пацієнтів із колоректальним раком виявили значний ефект, що приводив також до змін у загальній виживаності (Timar et al., 2006).

Прото-онкоген Jun B (JUNB)

Jun B є членом сімейства AP-1 (білок-активатор 1) димерних факторів транскрипції. Фактор транскрипції AP-1 бере участь у клітинній проліферації, трансформації і загибелі (Shaulian and Karin, 2002). JunB піддається регуляції через шлях NF-κB, і позитивна регуляція JunB, викликана дією HGF, може відігравати важливу роль у регуляції клітинної проліферації і клітинній інвазії через експресію MMP-9 (Lee and Kim, 2012). Очевидно, що JunB відіграє роль онкогена у лімфомах, особливо у ходжкінських лімфомах (Shaulian, 2010). JunB є дуже важливим регулятором p16, що знаходиться вище по ходу процесу і бере участь у підтриманні процесу клітинного старіння, що блокує злий процес переродження TAC. Таким чином, JunB напевно відіграє важливу роль у контролі канцерогенезу передміхурової залози (Konishi et al., 2008). JunB сприяє інвазивності пухлини і підсилює ангиогенез у VHL-дефіцитних клітинах ccRCC (Kanno et al., 2012).

Трансформуючий кислий біспіральний білок 3 (TACC3)

TACC3 існує у комплексі з ch-TOG (надмірно експресованим геном пухлин товстої кишки і печінки) і клатрином, який перехресно зшиває мікротрубочки у кінетохорних волокнах. TACC3 експресується у певних проліферативних тканинах, включаючи яєчка, легені, селезінку, кісний мозок, тимус і лейкоцити периферичної крові. Експресія TACC3 змінюється у деяких типах пухлин людини. У клітинах TACC3 локалізований як у хромосомах, так у мікротрубочках веретена, але не в астральних мікротрубочках (Hood and Royle, 2011). Експресія TACC3 корелювала з експресією p53, і пацієнти, у пухлинах яких спостерігалася підвищена експресія TACC3 і p53, мали значно гірший прогноз, ніж пацієнти, у пухлинах яких був виявлений низький рівень експресії у обох препаратів після імунозабарвлення (P=0,006). Вважається, що підвищення рівню TACC3 може сприяти проліферації НДРЛ і прогресуванню пухлини, і що рівень експресії TACC3 є значущим прогностичним фактором для кінцевого клінічного результату для НДРЛ (Jung et al., 2006). Tacc3 може бути негативним регулятором сигнального шляху Notch (Bargo et al., 2010).

RAD54 гомолог B (*S. cerevisiae*) (RAD54B)

Білок RAD54B репарації і рекомбінації ДНК є білком, що у людини кодується геном RAD54B. RAD54 зв'язується з дволанцюговою ДНК і виявляє АТФазну активність у присутності ДНК. Білок RAD54B людини є паралогом білка RAD54, який відіграє важливу роль у гомологічній

рекомбінації. Гомологічна рекомбінація (HR) є важливою для точної репарації дволанцюгових розривів (DSB) у молекулі ДНК (Sarai et al., 2008). Нокаун RAD54B, гена, про який відомо, що він є соматично мутованим при раку, викликає хромосомну нестабільність (CIN) у клітинах ссавців (McManus et al., 2009). Підвищена експресія гену RAD54B значуще пов'язана з більш коротким часом до прогресування і пов'язана з гіршою OS у пацієнтів із ГБМ (Grunda et al., 2010).

#### Еукаріотичний фактор елонгації трансляції 2 (EEF2)

EEF2 кодує члена сімейства GTP-зв'язувальних факторів елонгації трансляції. Цей білок є важливим фактором для синтезу білків. Він сприяє GTP-залежній транслокації у ланцюзі білка, що росте, від А-сайту до Р-сайту рибосоми. EEF2 високо експресувався у аденокарциномі легенів (АКЛ), але не в суміжній непухлинній тканині легенів. Передбачається, що eEF2 є антиапоптичним маркером у АКЛ, оскільки пацієнти з високим рівнем експресії eEF2 демонструють значно вищу частоту розвитку ранніх рецидивів пухлини і значно гірший прогноз. Сайленсинг експресії eEF2 підвищував елонгацію мітохондрій, клітинну аутофагію і чутливість до цисплатину. Більш того, eEF2 був сумоїлованим у клітинах АКЛ, і сумоїлювання eEF2 корелювало з лікарською резистентністю (Chen et al., 2011a). EEF2 є привабливою мішенню протиракової терапії, оскільки інгібування EEF2 викликає швидку зупинку синтезу білків, індуючи апоптоз і приводячи кінець кінцем до клітинної смерті. Викликаний міРНК сайленсинг EEF2 приводив до специфічної цитотоксичності для пухлинних клітин (Chen et al., 2011b; Wullner et al., 2008).

#### Циклін А2 (CCNA2)

CCNA2 належить до висококонсервативного сімейства циклінів. Цикліни відіграють роль регуляторів кіназ CDK. Різні цикліни виявляють різні картини експресії і деградації, які роблять свій внесок у часову координацію кожної події мітотичного циклу (Deshpande et al., 2005). Циклін А2 людини є ключовим регулятором проходження S-фази і входження в мітоз. CCNA2 зв'язує і активує кінази CDC2 або CDK2, і таким чином сприяє переходам у клітинному циклі, як від G1 до S-фази, так і від G2 до М-фази (Honda et al., 2012). Мутація, ампліфікація і надекспресія цього гена, які змінюють проходження клітин через клітинний цикл, часто спостерігаються у різних пухлинах і можуть сприяти онкогенезу (Cooper et al., 2009; Kars et al., 2011; Kim et al., 2011; Tompkins et al., 2011). Крім цього, біло описано, що експресія CCNA2 асоціюється з несприятливим прогнозом у декількох типах раку (Yasmeen et al., 2003) і що підвищена експресія цикліну А корелює з більш короткою тривалістю життя (Dobashi et al., 1998).

#### Ген 1, що трансформує нейроепітеліальні клітини (NET1) 41

NET1 є частиною сімейства факторів обміну Rho-гуаніннуклеотидів. Члени цього сімейства активують Rho білки, каталізую обмін ГДФ на ГТФ. Білок, який кодується NET1, взаємодіє з RhoA усередині ядра клітини і може відігравати певну роль у репарації пошкоджень у ДНК після дії іонізуючого випромінювання.

Ген NET1, але не опіодні рецептори, експресується у клітинах аденокарциномі молочної залози і може сприяти їх міграції (Esimovic et al., 2011). Має місце позитивна регуляція NET1 у тканинах раку шлунка (РШ), і він є рушійною силою інвазивного фенотипу цього захворювання (Srougi and Burridge, 2011). NET1 відіграє важливу роль у міграції та інвазії клітин РШ, які є ключовими аспектами прогресування РШ (Bennett et al., 2011). Більш високі рівні експресії RhoC і NET1 при раку передміхурової залози людини після короткострокової ендокринної терапії свідчать про те, що RhoC і NET1 можуть використовуватися як терапевтичні мішені під час ендокринної терапії (Kawata et al., 2012).

#### Хромосома 11 відкритої рамки зчитування 4 (C11orf24)

C11orf24 був ідентифікований у публікації Twells і співавт. (2001). Ген C11orf24 не має схожості ні з яким іншим геном, і його функціональне призначення невідоме. Нозерн-блот аналіз виявив високий рівень експресії 1.9-кб транскрипту у серці, плаценті, печінці, підшлунковій залозі і товстій кишці. Більш низькі рівні були виявлені у головному мозку, легенях, скелетних м'язах, нирках, селезінці, передміхуровій залозі, яєчках, яєчниках і тонкій кишці, а дуже низькі рівні були виявлені у тимусі і лейкоцитах (Twells et al., 2001). Білок C11orf24 довжиною у 449 амінокислот міститься на ділянці хромосоми 11q13. Ця ділянка описана як ділянка, що характеризує схильність до багатьох типів раку (Gudmundsson et al., 2009; Purdue et al., 2011).

#### Регулятор конденсації хромосом 1 (RCC1)

Регулятор конденсації хромосом 1 (RCC1) є фактором обміну гуаніннуклеотидів для ГТФази Ran. Локальна генерація Ran-ГТФ за участі RCC1 на хроматині є критичною для нуклеоцитоплазматичного транспорту, формування мітотичного веретена і формування ядерної оболонки (Hitakomate et al., 2010). Деякі дані означають, що зв'язування з хромосомами таких регуляторів мітозу, як RCC1, Mad2 і сурвівін є суттєвим фактором для проходження мітозу (Ho

et al., 2008). Wong і співавт. виявили, що рівень RanГТФ у ядрі знижується при протіканні ранніх стадій апоптозу, що корелює з імобілізацією RCC1 на хромосомах. Отже, вони висловили припущення, що RCC1 зчитує гістоновий код, створений каспаза-активованою Mst1, щоб стимулювати апоптоз шляхом зменшення рівню RanГТФ у ядрі (Wong et al., 2009).

#### 5 Сімейство антигенів меланоми F, 1 (MAGEF1)

Найбільш відомі члени суперсімейства MAGE (меланома-асоційовані антигени) експресуються у пухлинах, яєчках і тканинах плоду. Вони були описані як раково-тестикулярні антигени підгрупи MAGE-I. Пептиди підгрупи MAGE-I успішно використовувалися для вакцинації пептид-навантаженими ДК (Nestle et al., 1998; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1995; Thurner et al., 1999). У протилежність цьому, деякі гени MAGE (підгрупи MAGE-II), такі як MAGEF1, повсюдно експресуються в усіх досліджених тканинах дорослого організму і плодів, а також у пухлинах багатьох типів, включаючи пухлини яєчників, молочної залози, шийки матки, меланоми і при лейкемії (Nestle et al., 1998; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1995; Thurner et al., 1999). Тим не менш, надекспресія MAGEF1 була виявлена у клітинах НДРЛ (Tsai et al., 2007) і у 79 % пацієнтів тайванського походження, хворих на колоректальний рак (Chung et al., 2010).

#### 15 Не-SMC субодинаця D2 комплексу конденсину I (NCAPD2)

Конденсини є гетеропентамерними комплексами, які біли вперше ідентифіковані як структурні компоненти мітотичних хромосом. NCAPD2 є суттєвим компонентом конденсинового комплексу людини, який є необхідним для конденсації мітотичних хромосом. Виснаження NCAPD2 впливає на вирівнювання хромосом у метафазі і призводить до затримки входження в анафазу (Watrin and Legagneux, 2005). Проведені нещодавно дослідження взаємозв'язку і взаємозалежності показали, що локус 12p13 хромосоми є джерелом генетичних варіантів, що мають схильність до хвороби Альцгеймера (AD). Аналіз асоціацій окремих маркерів виявив, що обидва SNP у NCAPD2 (rs7311174 і rs2072374) характеризуються номінальними рівнями значущості  $p$  ( $p=0,0491$  і  $0,0116$ , відповідно). Цей генетичний аналіз надав свідчення того, що локус 12p13 хромосоми асоціюється з AD у населення китайського походження (Li et al., 2009).

#### 25 Хромосома 12 відкритої рамки зчитування 44 (C11orf44)

Проводячи у базах даних пошук ортологів білка, що взаємодіє з Atg13 мушки *Drosophila*, Mercer і співавт. (2009) ідентифікували ATG101 людини, також відомий як C12orf44 (Mercer et al., 2009). Ген ATG101 був картований на ділянці 2q13 хромосоми. Було висловлено очікування, що білок, у якому простежено 218 амінокислот, є гідрофільним цитозольним білком (Hosokawa et al., 2009). Макроаутофагія – це катаболічний процес опосередкованої лізосомами деградації цитоплазматичних білків, органел і макромолекул. Білки ATG, такі як ATG101, необхідні для утворення аутофагосом, двомембранних везикул, які оточують і ізолюють цитоплазматичний вантаж перед злиттям із лізосомами. ATG101 (C12orf44) є необхідним для аутофагії (Mercer et al., 2009).

#### 30 Домен HECT і RLD, що містять член E3 убіквітин-протеїн лігази 4 (HERC4)

HERC4 належить до сімейства убіквітин-лігаз HERC, усі вони містять домен HECT і принаймні 1 RCC1 (MIM 179710)-подібний домен (RLD). Очікується, що HECT-домен, що складається з 350 амінокислот, каталізує утворення тіоестеру з убіквітином перед переносом його до субстрату, також передбачається, що RLD діє як фактор обміну гуаніннуклеотидів для невеликих G-білків (Hochrainer et al., 2005). E3 убіквітин-лігаза Herc4, хоча повсюдно експресуються в усіх тканинах, найбільше експресується в яєчках, особливо під час сперматогенезу. Лігаза Herc4 необхідна для визрівання і видалення цитоплазматичних крапельок, щоб сперматозоїди набули повної функціональності (Rodriguez and Stewart, 2007).

#### 45 Зв'язувальний білок 3 мРНК гена, що кодує інсуліноподібний фактор росту 2 (IGF2BP3)

IGF2BP3 є членом сімейства РНК-зв'язувальних білків мРНК інсуліноподібного фактору росту II, що бере участь у локалізації, обороті і контролі трансляції мРНК. Цей білок містить декілька КН-доменів (К-гомологічних), які важливі для зв'язування РНК і про які відомо, що вони беруть участь у синтезі і метаболізмі РНК. Експресія відбувається головним чином під час розвитку ембріону, і вона була описана для деяких пухлин. Таким чином, вважається, що IGF2BP3 є канцероембріональним білком (Liao et al., 2005). IGF2BP3 може сприяти проліферації пухлинних клітин, підвищуючи синтез білка IGF-II та викликаючи адгезію і інвазію клітин через стабілізацію CD44-мРНК (Findeis-Hosey and Xu, 2012). Крім цього, експресія IGF2BP3 вивчалася у багатьох новоутвореннях людини. Отримується все більше свідств, що він є посередником у міграції, інвазії і виживанні клітин і у розвитку метастазів пухлин (Jeng et al., 2009; Kabbarah et al., 2010; Li et al., 2011; Liao et al., 2011; Lu et al., 2011; Hwang et al., 2012; Samanta et al., 2012) і також можливо, що він бере участь у ангиогенезі (Suvasini et al., 2011; Chen et al., 2012). У аденокарциномах легенів більш висока частота експресії IGF2BP3 може



бути виявленою у помірно або слабодиференційованих аденокарциномах, що може бути пов'язано з їх агресивною біологічною поведінкою (Findeis-Hosey et al., 2010; Beljan et al., 2012; Findeis-Hosey and Xu, 2012).

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

Білок CDC6 виконує функцію регулятора на ранніх стадіях реплікації ДНК. Він локалізований у ядрі під час фази G1 клітинного циклу, але переходить у цитоплазму на початку фази S. Крім цього, припускається, що CDC6 регулює активацію контрольної точки реплікації шляхом взаємодії з ATR у клітинах вищих еукаріотів (Yoshida et al., 2010). CDC6 є також суттєвим чинником для реплікації ДНК, і його дерегуляція відіграє роль у канцерогенезі. Було знайдено, що негативна регуляція CDC6 за допомогою інтерференції РНК (iРНК) перешкоджає проліферації клітин і сприяє апоптозу (Lau et al., 2006). Була виявлена надекспресія CDC6 при декількох типах раку. Серед типів раку, пухлини яких надмірно експресують CDC6, можна згадати рак шлунка (Tsukamoto et al., 2008), пухлини головного мозку (Ohta et al., 2001), плоскоклітинний рак порожнини рота (Feng et al., 2008), карциному шийки матки (Wang et al., 2009b) і злоякісну мезотеліому (Romagnoli et al., 2009).

Білок активації фібробластів, альфа (FAP)

Білок активації фібробластів (FAP) є інтегральним мембранним глікопротеїном II типу, що належить до сімейства серинових протеаз. Передбачувана протеазна активність серинового типу FAP-альфа та характер її індукції *in vivo* можуть свідчити про роль цієї молекули у контролі росту фібробластів або епітеліально-мезенхімальних взаємодіях під час розвитку і відновлення тканин і епітеліального канцерогенезу (Scanlan et al., 1994). Більшість нормальних тканин дорослого організму і доброякісних епітеліальних пухлин демонструють невелику або невиявлювану експресію FAP. Однак експресія FAP виявлена у стромі більш ніж 90 % злоякісних пухлин молочної залози, товстої і прямої кишки, легенів, шкіри і підшлункової залози, фібробластів ран, що загоюються, сарком м'яких тканин і деяких мезенхімальних ембріональних клітин FAP може відігравати певну роль у рості ракової пухлини і розвитку метастазів за рахунок процесів адгезії і міграції клітин, а також швидкої деградації компонентів ECM. Таким чином, він є присутнім на пухлинних клітинах, які проникають до ECM, і клітинах ендотелію, що беруть участь в ангиогенезі, але не експресується в неактивних клітинах того ж типу (Dolznic et al., 2005; Kennedy et al., 2009; Rettig et al., 1993; Rettig et al., 1994; Scanlan et al., 1994; Zhang et al., 2010a).

Сімейство сигнальних білків типу Wingless вірусів MMTV, що мають інтеграційний модуль, член 5A (WNT5A)

Взагалі Wnt5a регулює багато клітинних функцій, таких як проліферація, диференціація, міграція, адгезія і полярність (Kikuchi et al., 2012). Він експресується у недиференційованих ембріональних стовбурових клітинах людини (Katoh, 2008). WNT5A класифікується як нетрансформуючий член сімейства WNT, роль якого у канцерогенезі залишається невизначеною. Він виявляє пригнічуючу дію на пухлини деяких типів раку (цитоподібної залози, головного мозку, молочної залози, товстої і прямої кишки), але має місце його абераційна позитивна регуляція при раку легенів, шлунка і передміхурової залози (Li et al., 2010). Онкогенний WNT5A активує канонічний сигнальний шлях WNT у ракових стовбурових клітинах для самовідновлення і неканонічний сигнальний шлях WNT на межі поділу пухлина/строма для інвазії та метастазування (Katoh and Katoh, 2007). Експресія WNT5A була описана для багатьох типів пухлин. Наприклад, аномальна експресія білка Wnt5a спостерігалася у 28 % випадків раку передміхурової залози, де вона сприяє агресивності пухлини (Yamamoto et al., 2010). Більш того, було описано, що надмірна експресія WNT5A асоціюється з несприятливим прогнозом і (або) зростанням ступеню злоякісності раку яєчника (Badiglian et al., 2009), меланоми (Da Forno et al., 2008; Weeraratna et al., 2002), ГБМ (Yu et al., 2007), раку легенів (Huang et al., 2005) і раку підшлункової залози (Ripka et al., 2007). Вірогідно, що у ГЦК канонічний сигнальний шлях WNT сприяє ініціації пухлини, а неканонічний сигнальний шлях WNT - прогресії пухлини (Yuzugullu et al., 2009).

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

TPX2 є фактором формування веретена поділу. Він є необхідним для нормального формування мітотичного веретена і мікротрубочок у процесі апоптозу. TPX2 є необхідним для залежної від хроматину і (або) кінетохору нуклеації мікротрубочок (Bird and Human, 2008; Moss et al., 2009). Щойно синтезований TPX2 є необхідним для майже всієї активації Aurora A і для повного синтезу p53 і фосфорилування *in vivo* під час дозрівання ооцитів (Pascreau et al., 2009). TPX2 є асоційованим з клітинами білком, який надмірно експресується у багатьох типах пухлин, таких як мєнінгіома (Stuart et al., 2010), плоскоклітинний рак гортані (SCCL) (Cordes et al., 2010), плоскоклітинний рак порожнини рота (SCC) (Shigeishi et al., 2009), гепатоцелюлярні карциноми (ГЦК) (Satow et al., 2010), пухлина підшлункової залози (Warner et al., 2009), рак яєчників

(Ramakrishna et al., 2010), плоскоклітинна карцинома легенів (Lin et al., 2006; Ma et al., 2006). Він часто надмірно експресується сумісно з Aurora-A, приводячи до утворення ново функціональної одиниці з онкогенними властивостями (Asteriti et al., 2010). Експресія TPX2 є прогностичним індикатором раку легенів (Kadara et al., 2009).

#### 5 Рецептор гіалуронан-опосередкованої рухливості (RHAMM) (HMMR)

Рецептор гіалуронан-опосередкованої рухливості RHAMM (HMMR) виконує різні функції у клітині, а також у клітинній мембрані. RHAMM можна експортувати на поверхню клітин, де він зв'язує гіалуронову кислоту (HA) і взаємодіє з HA-рецептором CD44. Такі процеси, як рухливість, загоєння ран і інвазія модулюються RHAMM (Sohr and Engeland, 2008). RHAMM (рецептор для HYA-опосередкованої рухливості) є одним із рецепторів для гіалуронану (HYA) (Gares and Pilarski, 2000). Ракові клітини також експонують сайти зв'язування (CD44, RHAMM, тощо) для HYA, і HYA захищає ракові клітини від атаки імунних клітин. Рівень HYA у сироватці часто є підвищеним у пацієнтів із метастазами (Delpech et al., 1997). Крім цього, було висловлено припущення, що взаємодія HYA з RHAMM (HMMR) і CD44 на ракових клітинах є важливою для сприяння прогресії і дисемінації пухлини (Li et al., 2000b). Крім цього, RHAMM надмірно експресується у тканинах декількох типів ракових пухлин (Tzankov et al., 2011); (Kramer et al., 2010); (Twarock et al., 2010); (Shigeishi et al., 2009); (Zlobec et al., 2008); (Li et al., 2000a)).

#### ADAM металопептидазний домен 8 (ADAM8)

20 ADAM8 є членом сімейства ADAM (домен дезінтегрину і металопротеїнази) Багато видів ADAM, включаючи ADAM8, експресуються у злоякісних пухлинах людини, де вони беруть участь у регулюванні активності фактора росту і функцій інтегрину, що призводить до стимулювання росту і інвазії пухлин (Mochizuki and Okada, 2007). Експресія ADAM8 показала позитивну кореляцію з EGFR. Обидва головним чином експресувалися у цитоплазмі і на клітинній мембрані (Wu et al., 2008). ADAM8 інтенсивно експресувався у більшості досліджених видів раку легенів. Екзогенна експресія ADAM8 підвищувала міграційну активність клітин ссавців, що є показником того, що ADAM8 може відігравати значну роль у прогресуванні раку легенів (Ishikawa et al., 2004). ADAM8 пов'язаний з несприятливим прогнозом раку легенів (Hernandez et al., 2010). Надмірна експресія ADAM8 асоціюється з меншою тривалістю життя пацієнтів, і він служив хорошим провісником ризику віддалених метастазів при RCC (Roemer et al., 2004b; Roemer et al., 2004a). Крім цього, рівні експресії і протеазна активність ADAM8 корелювали з інвазійною активністю клітин гліоми, що свідчить про те, що ADAM8 може відігравати значну роль у інвазії пухлин при раку головного мозку (Wildeboer et al., 2006).

#### 35 Колаген, тип VI, альфа-3 (COL6A3)

COL6A3 кодує альфа-3 ланцюг, один із трьох альфа-ланцюгів колагену типу VI. Було показано, що домени білка зв'язують білки позаклітинного матриксу. Ця взаємодія пояснює важливість цього колагену в організації компонентів матриксу.

Ремоделювання позаклітинного матриксу шляхом надекспресії 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-Baust et al., 2003). COL6A3 надмірно експресується у тканинах колоректальної пухлини (Smith et al., 2009a), карциноми слинної залози (Leivo et al., 2005) і диференційно експресується при раку шлунка (Yang et al., 2007). COL6A3 був ідентифікований як один із семи генів із пухлино-специфічними сплайс-варіантами. Підтверджені пухлино-специфічні зміни сплайсингу були послідовними, даючи змогу легко розділити нормальні і ракові зразки і у деяких випадках навіть зразки різних стадій розвитку пухлини (Thorsen et al., 2008).

#### Антиген на поверхні клітин Thy-1 (THY1)

Thy-1 (CD90) є заякореним на глікозилфосфатиділінозитолі (GPI) глікопротеїном із молекулярною масою 25-37 кДа, який експресується на багатьох видах клітин, включаючи Т-клітини, тимоцити, нейрони, клітини ендотелію і фібробласти. Активація Thy-1 може сприяти активації Т-клітин. Thy-1 також впливає на численні біологічні процеси неімунної природи, включаючи клітинну адгезію, ріст аксонів, ріст пухлини, пригнічення росту пухлини, міграцію, загоєння ран і клітинну смерть. Thy-1 є важливим регулятором міжклітинної взаємодії і взаємодії клітини з матриксом, він відіграє важливу роль у регенерації нервів, метастазуванні, запаленні і фіброзі (Rege and Nagood, 2006b; Rege and Nagood, 2006a). Більш того, Thy-1 є, очевидно, маркером для ангіогенезу у дорослих, але не у ембріонів. Позитивна регуляція Thy-1 цитокінами, але не факторами росту, свідчить про важливість запалення у патогенезі ангіогенезу у дорослих (Lee et al., 1998). Спостерігається значно підвищена експресія Thy-1 у ядрах клітин раку легенів у порівнянні з нормальними тканинами або з доброякісними пухлинами легенів, і вона є одним із факторів, що мають відношення до прогнозу у пацієнтів,

хворих на НДРП. Таким чином, Thy-1 може використовуватися як новий маркер латентного періоду росту злоякісних пухлин при діагностиці патології раку легенів (Chen et al., 2005b). Thy-1 можна вважати сурогатним маркером для різних видів стовбурових клітин (мезенхімальних стовбурових клітин, стовбурових клітин печінки ("овальних клітин") (Masson et al., 2006),

5 стовбурових клітин, отриманих із кератоцитів (Nakamura et al., 2006), і гематопоетичних стовбурових клітин (Yamazaki et al., 2009).

Дейодиназа, йодтиронін, тип II (DIO2)

Білок, що кодується геном DIO2, належить до сімейства йодтиронін-дейодиназ. Він експресується на високому рівні у щитоподібній залозі і може значно сприяти відносному підвищенню продукції Т3 щитоподібною залозою у пацієнтів з хворобою Грейвса і аденомою щитоподібної залози (Meyer et al., 2008); (de Souza Meyer et al., 2005)). Картина експресії генів значно відрізняється для різних типів розповсюдження назофарингеальної карциноми (NPC), "нагору" і "донизу". Експресія гена DIO2 вище для типу прогресування "донизу" (донизу = віддалені метастази), ніж для типу прогресування "нагору" (локальний ріст і інвазія у основі черепа), що може мати безпосередній зв'язок із метастатичним потенціалом NPC (Liang et al., 2008). мРНК DIO2, так само як і власне DIO2, експресуються у пухлинах головного мозку (Murakami et al., 2000). DIO2 є присутньою у легенях, її рівень подібний у тканинах периферичного раку легенів і центрального раку легенів (Wawrzynska et al., 2003).

Періостин, остеобласт-специфічний фактор (POSTN)

POSTN, ген, який кодує білок, подібний до сімейства фасциклінів, причетний до виживання клітин і ангиогенезу, привернув увагу як перспективний маркер прогресування пухлин людини для раку різних типів (Ruan et al., 2009).

Високий рівень експресії білка періостину або мРНК був виявлений у більшості солідних пухлин, включаючи карциноми молочної залози (Zhang et al., 2010b), товстої кишки (Kikuchi et al., 2008), голови і шиї (Kudo et al., 2006), підшлункової залози (Kanno et al., 2008), папілярного раку щитоподібної залози (Purpin et al., 2008), карциноми передміхурової залози (Tischler et al., 2010), яєчників (Choi et al., 2010), легенів (Takanami et al., 2008) і печінки (Utispan et al., 2010), а також плоскоклітинній карциномі стравоходу (Kwon et al., 2009). Періостин експресується на аномально високому рівні при раку легенів, це корелює з ангиогенезом, інвазією і метастазуванням (Takanami et al., 2008). Сайленсинг періостину у клітинах недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ) A549 інгібує ріст пухлинних клітин і зменшує інвазію клітин (Wu et al., 2013).

SLIT1 (гомолог Slit 1 (Drosophila)), SLIT2 (гомолог Slit 2 (Drosophila))

SLIT (SLIT1, SLIT2 і SLIT3) є сімейством секретованих білків, які є посередниками у позиційних взаємодіях між клітинами та їхнім оточенням під час розвитку з використанням сигнального шляху за участі ROBO-рецепторів (Hinck, 2004). Однак сигнальний шлях SLIT/ROBO не обмежений процесами розвитку, і втрата цих стимуляторів, очевидно, відіграє важливу роль у процесі прогресування пухлини. Сімейства Slit і Robo вважаються кандидатами у гени-супресори пухлин, оскільки їх промотори часто є гіперметильованими у разі епітеліального раку (Narayan і співавт., 2006; Schmid і співавт., 2007; Latil і співавт., 2003). Приблизно у 50 % зразків пухлин молочної залози людини експресія генів SLIT2 або SLIT3 є пригніченою (Sharma і співавт., 2007). Гіперметилування SLIT2 часто виявлялося у хворих на НДРЛ і асоціювалося з різними клінічними ознаками (Suzuki і співавт., 2013).

TLX3 (Т-клітинний лейкоз, гомеобокс 3)

TLX3 (відомий також як RNХ або HOX11L2) належить до сімейства генів-сиріт, що містять гомеобокс, вони кодують ядерні фактори транскрипції, що зв'язують ДНК. Члени сімейства генів HOX11 відрізняються тим, що треонін-47 заміщує цитозин у висококонсервативному гомеодомені (Dear і співавт., 1993). TLX3 унікально експресується у довгастому мозку, що розвивається. Він є необхідним для належного формування вісцеральних релейних сенсорних нейронів першого порядку і більшості (нор)адренергічних центрів стовлової частини головного мозку, особливо тих, що причетні до фізіологічного контролю серцево-судинної і респіраторної систем (Qian і співавт., 2001). Експресія TLX3 була також виявлена у зразках тканин хворих на лейкемію, у 20 % дітей і 13 % дорослих, що потерпають від Т-клітинної гострої лімфоцитної лейкемії (Cave і співавт., 2004), хоча цей ген ніколи не приймав участь у диференціації нормальних Т-клітин (Ferrando і співавт., 2004).

CER192 (Центросомальний білок 192 кДа)

Центросоми відіграють важливу роль у різних клітинних процесах, включаючи формування веретена поділу і сегрегацію хромосом. CER192 є хромосомним білком, який відіграє ключову роль у біогенезі і функціонуванні центросоми у ссавців, Drosophila і C. elegans (Gomez-Ferreria і співавт., 2012). Він стимулює формування клітинного каркаса, на якому кільцеві комплекси гама-

тубуліну та інші білки, що беруть участь у нуклеації мікротрубочок і формуванні веретена поділу, набувають функціональність під час мітозу (Gomez-Ferrera і співавт., 2007).

ANKS1A (анкіриновий повтор і стерильний альфа-мотив, домен, що містить 1A)

Анкіриновий повтор і білок 1A, що містить SAM-домен, є білком, який в організмі людини кодується геном ANKS1A (Nagase і співавт., 1996). Вперше ANKS1A був описаний як мішень і передавач сигналу рецепторних тирозинкіназ на зразок EGFR і PDGFR (Pandey і співавт., 2002), а більш нещодавно - як партнер по взаємодії з рецепторною тирозинкіназою EphA8 (Shin і співавт., 2007). У нещодавно проведеному дослідженні одонуклеотидні поліморфні (SNP) маркери 348 пацієнтів із НДРЛ на пізніх стадіях піддавали генотипуванню. Були виявлені 17 найкращих SNP-кандидатів, пов'язаних з прогнозуванням. SNP знаходилися в геномній ділянці гену ANKS1A (Lee і співавт., 2013).

CEP250 (центросомальний білок 250 кДа)

Ген CEP250 кодує коровий центросомальний білок, необхідний для подвоєння центріолей під час інтерфази клітинного циклу (Mayor і співавт., 2002). Використовуючи радіаційні гібриди, Fry і співавт. (1998) картували ген CEP250 на хромосомі 20, приблизно на ділянці 20q11.2 (Fry і співавт., 1998). Mayor і співавт. (2002) виявили, що надекспресія CEP250 в клітинній лінії остеосаркоми людини приводить до формування великих асоційованих із центросомами структур. Надекспресія CEP250 не заважала розділу центросом або поділу клітин, що вказує на те, що CEP250 дисоціює від центросом під впливом активності, яка регулюється клітинним циклом (Mayor і співавт., 2002).

MDN1 (MDN1, гомолог мідазину (дріжджі))

MDN1, гомолог мідазину (дріжджі) є білком, який в організмі людини кодується геном MDN1. Мідазин є присутнім як однокопійний ген, який кодує висококонсервативний білок молекулярною масою приблизно 600 кДа в усіх еукаріотах, для яких існують дані. У людини ген картується на 6q15 і кодує передбачуваний білок, що складається з 5596 залишків (632 кДа) (Garbarino і Gibbons, 2002). Нещодавно було показано, що MDN1 є мутованим у хворих на рак молочної залози підтипу люмінальний В. MDN1 може брати участь у розвитку і у гормонорезистентності цього агресивного підтипу (Cornen і співавт., 2014).

OLFM1 (олфактомедин 1)

OLFM1, який також має назву ноелін-1, є секретованим глікопротеїном, що належить до сімейства білків, які містять олфактомединовий домен і відіграють важливу роль у регуляції продукції клітин нервового гребінця з нервової трубки (Barembaum і співавт., 2000). Олфактомедин був первісно ідентифікований як головний компонент слизового шару, який оточує хемосенсорні дендрити нюхових нейронів (Kulkarni і співавт., 2000). Експресія білка олфактомедину 1 була значно вищою у аденокарциномі легенів, ніж у тканинах раку легенів інших гістологічних типів і нормальних тканинах легенів (Wu і співавт., 2010). Крім цього, спостерігається дерегуляція OLFM1 при раку ендометрію, саркомі Юінга і нейробластомі (Wong і співавт., 2007; Allander і співавт., 2002; Khan і співавт., 2001).

BUB1B (брунькування, що не інгібується гомологом бензімідазолу 1 бета (дріжджі))

BUB1B, також відомий під назвою BubR1, є коровим компонентом мітотичної контрольної точки, який зв'язується з і інгібує Cdc20-активованій комплекс стимуляції анафази (APC/CCdc20), убіквітин Е3-лігазою, що запускає анафазу за рахунок регуляції опосередкованого сепаразою розщеплення кілець когезину, які утримують сестринські хроматиди разом (Baker і співавт., 2004). BubR1 не тільки бере участь у належній сегрегації хромосом шляхом активації у контрольній точці мітотичного циклу, але також шляхом регуляції прикріплення хромосом до веретена (Malureanu і співавт., 2009; Lampson і Karoor, 2005). У багатьох формах раку було виявлено порушення функції контрольної точки веретена. Був встановлений зв'язок мутацій в BubR1 з мозаїчною переміжною анеуплоїдією (MVA), синдром, який у людини спостерігається рідко, для якого характерна анеуплоїдизація, схильність до утворення пухлин і декілька характерних прогероїдних особливостей, включаючи коротку тривалість життя, невеликий зріст і розумову відсталість, катаракту і незбалансований генетичний поліморфізм (Matsuura і співавт., 2006).

PI4KA (фосфатидилінозитол-4-кіназа, каталітична, альфа)

Очікується, що у клітинах організму людини присутні чотири різні фосфатидилінозитол-4-кінази (PI4K). Ці ізоферменти (PI4KA, PI4KB, PI4K2A і PI4K2B) каталізують фосфорилування фосфатидилінозиту (PtdIns) на цитоплазматичній поверхні клітинних мембран, приводячи до отримання фосфатидилінозитол-4-фосфату (PtdIns4P) (Minogue і Waugh, 2012). PI4KA головним чином знаходили у ендоплазматичному ретикулумі (ER). Очевидно, що її функції полягають як у регулюванні формування сайтів виходу із ER (Blumental-Perry і співавт., 2006), а також у регулюванні концентрації PtdIns4P у плазматичній мембрані (Balla і співавт., 2008). Група

дослідників виявила, що більше P14KA мРНК міститься у ГЦК, ніж у нормальних здорових тканинах. Ця позитивна регуляція значуще корелювала як із низьким ступенем диференціації, так і з високою швидкістю проліферації у ГЦК. Таким чином, P14KA можливо використовувати як молекулярний маркер з метою удосконалення прогностичних моделей для ГЦК (Ilboudo і співавт., 2014).

#### AURKB (кіназа Aurora B)

Кіназа Aurora B є білком, функція якого полягає у прикріпленні мітотичного веретена до центромер (Kim і співавт., 2011). AURKB локалізується з мікротрубочками біля кінетохор (Kunitoku і співавт., 2003). Кінази групи Aurora надмірно експресуються у багатьох лініях пухлинних клітин, що дозволяє припустити, що ці кінази можуть відігравати певну роль в онкогенезі, і вони вже стали потенційними мішенями при діагностиці раку і для терапії (Fu і співавт., 2007). Нещодавно був ідентифікований генетичний підпис п'яти генів (TOP2A, AURKB, BRRN1, CDK1 і FUS), які тісно пов'язані з кінцевим клінічним результатом у пацієнтів з НДРЛ. Ці результати можуть свідчити, що гени, які беруть участь у конденсації хромосом, такі як AURKB, можливо, пов'язані з властивостями подібно притаманним стовбуровим клітинам, і вони можуть служити для прогнозу виживання при аденокарциномі легенів (Pegumal і співавт., 2012).

SLC3A2 (сімейство переносників розчинених речовин 3 (активатори транспорту двоосновних і нейтральних амінокислот, член 2)

SLC3A2 включає легку субодиницю транспортеру великих нейтральних амінокислот (LAT1), який також має назву CD98 (кластер диференціації 98) (Lemaitre і співавт., 2005). Гетеродимер CD98 складається з важкого ланцюга типу II однопровідного трансмембранного білка (CD98hc, також відомий як важкий ланцюг антигену 4F2 або FRP-1; кодується генами SLC3A2 і Slc3a2 у людини і мишей, відповідно) вагою приблизно 80 - 85 кДа, який зв'язаний дисульфідним зв'язком із легким ланцюгом білка, що проходить крізь мембрану декілька разів, вагою приблизно 40 кДа (Deves і Boyd, 2000). Функція CD98hc полягає в підсиленні сигнальних властивостей інтегринів і в транспорті амінокислот. Обидві ці функції можуть сприяти виживанню і проліферації клітин (Cantor і Ginsberg, 2012). Багато пухлин експресують CD98hc (SLC3A2), і його експресія корелює з несприятливим прогнозом при лімфомах В-клітин. Крім цього, майже всі дослідження, у яких вивчалася експресія CD98hc або легких ланцюгів CD98 у солідних пухлинах, демонструють, що їх експресія корелює з прогресуючими або метастатичними пухлинами (Kaïra і співавт., 2009).

#### IFT81 (внутрішньоджгутиковий транспорт 81 гомолог (Chlamydomonas))

Внутрішньоджгутиковий транспорт (IFT) попередників війок, таких як тубулін, із цитоплазми до кінчиків війок, є ланкою побудови конструкції війки, волосоподібної органели, знайденої у більшості клітин еукаріотів. Нокдаун IFT81 і експерименти з урятування з точковими мутантами показали, що тубулін, що зв'язується IFT81, є необхідним для циліогенезу у клітинах людини (Bhogaraju і співавт., 2013). Разом із IFT74/72, IFT81 утворює коровий комплекс для побудови частинки IFT, які є необхідними для формування війок (Lucker і співавт., 2005).

#### COG4 (компонент олігомерного комплексу Гольджі 4)

Комплекс COG складається з восьми субодиниць, що мають назву COG1–8 (Ungar і співавт., 2002; Whyte і Munro, 2001), згрупованих у два субкомплекси: COG1-4 (Доля А) і COG5–8 (Доля В) (Ungar і співавт., 2005). Функція комплексу COG полягає у утримуванні везикул, у яких відбувається рециклінг резидентних білків апарату Гольджі (таких як ферменти глікозилювання (Pokrovskaya і співавт., 2011) Ген COG4 картується в локусі 16q22.1 хромосоми (Reynders і співавт., 2009). Ungar і співавт. (2002) дійшли до висновку, що COG4 має найважливіше значення для структури і функціональної активності апарату Гольджі і що він може впливати на внутрішньоклітинний транспорт мембран (Ungar і співавт., 2002).

#### NCBP1 (ядерний кеп-зв'язувальний білок, субодиниця 1, 80 кДа)

Ядерний кеп-зв'язувальний білковий комплекс є РНК-зв'язувальним білком, який зв'язується з 5'-кепом РНК-полімерази II. Kataoka і співавт. (1994) описали клонування гена, що кодує ядерний кеп-зв'язувальний білок (NCBP1) молекулярною масою 80 кДа, виявлений у екстрактах ядер клітин HeLa, які, можливо, беруть участь у сплайсингу мРНК і експорті РНК (Kataoka і співавт., 1994). Шляхом гібридизації геномної ДНК із панелі гібридів соматичних клітин Chadwick і співавт. (1996) картували ген NCBP1 в локусі 9q34.1 (Chadwick і співавт., 1996).

#### NEFH (нейрофіламент, важкий поліпептид)

NEFH, який кодує важкий ланцюг нейрофіламенту, є одним із головних компонентів нейрофіламентів нейронального цитоскелету. Ген, що кодує поліпептид важкого ланцюга нейрофіламенту (NEFH, 200 кДа) знаходиться у полісі хромосоми 22q12.2, його запропонували використовувати як ДНК-маркер пресимптоматичного діагнозу сімейства нейрофіброматозів 2 типу (NF2). Про втрату негативної регуляції NEFH повідомлялось здебільшого при пухлинах

вегетативних нервів людини або при центральних нейроцитомах (Mena et al., 2001; Segal et al., 1994). Крім цього, спостерігалась відсутність або зниження експресії NEFH у клітинах раку передміхурової залози (Schleicher et al., 1997), світлоклітинних пухлин епітеліоїдних тканин (Tanaka et al., 2000) і дрібноклітинної карциноми легенів (Bobos et al., 2006) у людини. Що цікаво, надмірна експресія NEFH порушувала структуру і функціональну активність клітин і спричиняла загибель клітин (Szebenyi et al., 2002).

Повний опис винаходу

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 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, а у випадку пептидів, що зв'язані з молекулами МНС II класу, вони можуть досягати такої довжини, як 15, 16, 17, 18, 19 або 20 амінокислот.

Термін "пептид" використовується також для позначення солей серії амінокислотних залишків, що з'єднані одне з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Переважно, щоб ці солі були фармацевтично прийнятними солями.

Термін "пептид" повинен включати "олігопептид". 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 винаходу за умови, що він містить правильний епітоп чи епітопи. Олігопептиди зазвичай коротші, ніж довжиною близько 30 амінокислотних залишків, і довші, ніж довжиною близько 15 амінокислотних залишків.

Термін "пептиди за цим винаходом" повинен включати пептиди, що складаються або містять пептид згідно з наведеним вище визначенням відповідно до послідовностей від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 92.

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. В іншому аспекті імуноген може бути пептидом, комплексом пептиду з МНС, олігопептидом і (або) білком, який використовується для продукції специфічних антитіл або ТКР проти нього.

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

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

Таблиця 2: Частоти експресії F для HLA-A\*02 і найбільш поширених серотипів HLA-DR. Частоти отримані з частот виявлення гаплотипів G<sub>i</sub> серед населення США, адаптовано з публікації Mori і співавторів (Mori et al., 1997) з використанням формули Харді-Вайнберга:  $F = 1 - (1 - G_i)^2$ . Комбінація A\*02 з певними алелями HLA-DR внаслідок незрівноваженого зчеплення може бути збагаченою або збідненою у порівнянні з передбачуваною на основі індивідуальних частот виявлення. Детальну інформацію див у Chanock і співавторів (Chanock et al., 2004).

Таблиця 2

	Частоти експресії F для HLA*A02 і серотипів HLA-DR серед північно-американського населення			
Алель HLA	Американці європеїдної раси	Афроамериканці	Американці монголоїдної раси	Латиноамериканці
A*02	49,1 %	34,1 %	43,2 %	48,3 %
DR1	19,4 %	13,2 %	6,8 %	15,3 %
DR2	28,2 %	29,8 %	33,8 %	21,2 %
DR3	20,6 %	24,8 %	9,2 %	15,2 %
DR4	30,7 %	11,1 %	28,6 %	36,8 %
DR5	23,3 %	31,1 %	30,0 %	20,0 %
DR6	26,7 %	33,7 %	25,1 %	31,1 %
DR7	24,8 %	19,2 %	13,4 %	20,2 %
DR8	5,7 %	12,1 %	12,7 %	18,6 %
DR9	2,1 %	5,8 %	18,6 %	2,1 %

Таким чином, для терапевтичних і діагностичних цілей дуже бажано використовувати пептид, який зв'язується з належною афінністю з декількома різними рецепторами HLA II класу.

5 Пептид, що зв'язується з декількома різними молекулами HLA II класу, має назву проміскуїтетного зв'язувача.

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

15 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 дезоксирибонуклеотида.

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

25 Термін "нуклеотидне кодування пептиду" в контексті цього винаходу означає нуклеотидну послідовність, що кодує пептид, включаючи штучні (створені руками людини) старт- і стоп-кодони, сумісні з біологічною системою, якою ця послідовність буде експресуватися.

Термін "продукт експресії" означає поліпептид або білок, який 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).

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

35 Термін "сегмент ДНК" відноситься до полімеру ДНК у формі окремого фрагмента чи як компонент більшої конструкції ДНК, що одержаний з ДНК, виділеної принаймні один раз по суті в чистій формі, тобто без забруднюючих ендogenous матеріалів та в кількості чи концентрації, яка дає змогу ідентифікувати, виконувати маніпуляції та відновлювати сегмент і його складові нуклеотидні послідовності за допомогою стандартних біохімічних методів, наприклад, з використанням 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 присутні за відкритою рамкою зчитування, де вони не заважають маніпуляціям або експресії кодуючих ділянок.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(ii) кожний розрив у Контрольній послідовності та

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



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

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

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

10 Первісні (немодифіковані) пептиди, що розкриваються в цьому винаході, можуть модифікуватися заміщенням одного чи кількох залишків на різних, можливо, селективних, ділянках пептидного ланцюга, якщо не зазначено інакше.

15 Переважно, щоб ці заміщення знаходилися на кінці амінокислотного ланцюга. Такі заміщення можуть бути консервативного характеру, наприклад, коли одна амінокислота замінюється амінокислотою подібної структури та характеристик, наприклад, коли гідрофобна амінокислота замінюється іншою гідрофобною амінокислотою. Навіть більш консервативною буде заміна амінокислот такого ж чи подібного розміру та хімічного характеру, наприклад, коли лейцин замінюється на ізолейцин. В дослідженнях варіацій послідовностей в сімействах природних гомологічних білків певні амінокислотні заміщення допускаються частіше, ніж інші, і вони часто демонструють кореляцію зі схожістю за розміром, зарядом, полярністю та гідрофобністю між первісною амінокислотою та її заміною, і це є основою для визначення "консервативних заміщень".

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

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

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

45 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.

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

Комбінації подовжень за цим винаходом можуть бути проілюстровані таблицею 3:

Таблиця 3

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

Амінокислотами для подовжень можуть бути пептиди вихідної послідовності білка або будь-яка інша амінокислота. Подовження може використовуватися для підвищення стабільності або розчинності пептидів.

Термін "Т-клітинна відповідь" означає специфічну проліферацію та активацію ефекторних функцій, індукованих пептидом *in vitro* чи *in vivo*. Для ЦТЛ, обмежених МНС класу I, ефекторними 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 ефекторних молекул, переважно гранзимів чи перфоринів, індукована пептидом, або дегрануляція.

Переважно, коли ЦТЛ, специфічні по відношенню до пептиду з послідовністю від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 92, досліджують у порівнянні із заміщеними пептидами, причому концентрація пептиду, за якої заміщені пептиди досягають половини максимального росту лізису відносно фонових значень, є не більше ніж 1 мМ, переважно не більше ніж 1 мкМ, ще більш переважно не більше ніж приблизно 1 нМ, і ще більш переважно не більше ніж приблизно 100 пМ, і найбільш переважно не більше ніж приблизно 10 пМ. Переважно також, щоб заміщений пептид розпізнавався 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 залишки від контрольного пептиду, оскільки вони мають по суті ідентичну антигенну активність.

Стимуляція імунної відповіді залежить від присутності антигенів, що сприймаються імунною системою хазяїна як чужорідні. Відкриття пухлино-асоційованих антигенів зробило можливим в даний час 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 клітинної імунної відповіді 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. Важливу роль у цій відповіді відіграють, зокрема, CD8-позитивні Т-клітини, які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності I класу (МНС). Ці пептиди зазвичай складаються з 8-12 амінокислотних залишків, що отримані з білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP), які містяться у цитозолі. Молекули МНС людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

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 ядерних білків, 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 I класом називається у науковій літературі крос-презентацією.

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 легенів зокрема. Більш того, існує потреба ідентифікувати фактори, які можливо буде використовувати для лікування раку взагалі і раку шлунка зокрема.

Предметом цього винаходу є пептиди для лікування раку та інших пухлин, переважно ракових пухлин легенів, навіть більш переважно — недрібноклітинної карциноми легенів (НДРЛ), які надмірно чи виключно презентують пептиди за цим винаходом. Ці пептиди, за даними мас-спектрометрії, презентуються природно молекулами HLA на зразках тканин первинного раку легенів (див. приклад 1 і фігуру 1).

Вихідний ген/білок (який також визначається як "повнорозмірний білок" або "базовий білок"), із якого отримані пептиди, як було показано, відзначається високою надекспресією у клітинах недрібноклітинної карциноми легенів, і для послідовностей від SEQ ID NO 66 до 75 раку шлунка і гліобластоми у порівнянні з нормальними тканинами (див. приклад 2 і фігуру 2 для НДРЛ) що свідчить про високий ступінь зв'язку пухлин із вихідними генами. Більш того, самі пептиди дуже надмірно презентуються на тканинах пухлини, але не на нормальних тканинах (див. приклад 3 і фігуру 3).

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

Було показано, що пептиди за цим винаходом здатні стимулювати відповідь Т-клітин і (або) надмірно презентуються, і, таким чином, можуть використовуватися для отримання антитіл і (або) ТКР, особливо рТКР за цим винаходом (див. приклад 4 і фігуру 4). Більш того, пептиди, якщо вони утворюють комплекси з відповідними молекулами МНС, також можуть використовуватися для продукції антитіл і (або) ТКР, особливо рТКР за цим винаходом. Відповідні способи добре відомі фахівцю у цій галузі, і їх описи можна знайти також у відповідній літературі. Отже, пептиди за цим винаходом можуть використовуватись для генерації імунної відповіді організму пацієнта, завдяки чому клітини пухлини можуть бути зруйновані. Імунна відповідь організму пацієнта може індукуватися прямим введенням пацієнту описаних пептидів або відповідних прекурсорних речовин (наприклад, подовжених пептидів, білків або нуклеїнових кислот, які кодують ці пептиди), ідеально в комбінації з агентом, що підвищує імунну реакцію (тобто, ад'ювантом). Можна очікувати, що імунна відповідь, що виникає в результаті такої терапевтичної вакцинації, є високо специфічною по відношенню до клітин пухлини, оскільки 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 контексті цього винаходу означає похідну сполуку розкритих пептидів, в якій пептид модифікується шляхом створення кислоти чи основної солі речовини. Наприклад, кислі солі готуються з вільної основи (як правило, де нейтральна форма лікарського засобу має нейтральну  $-NH_2$ -групу), за участю реакції з прийнятною кислотою. Прийнятні кислоти для приготування кислих солей включають органічні кислоти, такі, наприклад, як оцтова кислота, пропіонова кислота, гліколева кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, яблучна кислота, малінова кислота, бурштинова кислота, малеїнова кислота, фумарова кислота, винна кислота, лимонна кислота, бензойна кислота, корична кислота, мигдальна кислота, метансульфо кислота, етансульфо кислота, п-толуолсульфо кислота, саліцилова кислота і т. ін., а також неорганічні кислоти, наприклад, соляна кислота, бромистоводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота і т. ін. І навпаки, приготування основних солей кислотних компонентів, які можуть бути присутніми на пептиді, здійснюється з використанням фармацевтично прийнятної основи, такої як гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид амонію, гідроксид кальцію, триметиламін і тому подібні.

В особливо переважному втіленні фармацевтичні композиції містять пептиди у вигляді солей оцтової кислоти (ацетати) 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 легенів і оскільки було визначено, що ці пептиди не є присутніми у нормальних тканинах або присутні у низькій кількості, ці пептиди можуть використовуватися для діагностики наявності раку.

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

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

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

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

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

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

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

принаймні один фаг експонує згадане антитіло, що може специфічно зв'язуватися із згаданим головним комплексом гістосумісності (МНС) людини I або II класу, який входить до складу комплексу із згаданим антигеном, рестрикованим за HLA. Відповідні способи продукування таких антитіл і одноланцюгових головних комплексів гістосумісності (МНС) I або II класу, а також інших інструментів отримання цих антитіл розкриті в заявках WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 і статтях: Cohen CJ, Denkberg G, Lev A, Epel M, Reiter Y. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. *J Mol Recognit.* 2003 Sep-Oct;16(5):324-32.; Denkberg G, Lev A, Eisenbach L, Benhar I, Reiter Y. Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody with TCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen. *J Immunol.* 2003 Sep 1;171(5):2197-207; і Cohen CJ, Sarig O, Yamano Y, Tomaru U, Jacobson S, Reiter Y. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. *J Immunol.* 2003 Apr 15; 170(8) : 4349-61, які для цілей цього винаходу всі у прямій формі включені в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

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

У ще одному аспекті цей винахід стосується способу отримання розчинного Т-клітинного рецептора, що розпізнає конкретний комплекс пептиду і МНС. Такі розчинні Т-клітинні рецептори можуть бути отримані зі специфічних клонів Т-клітин, і їх спорідненість можна підвищити мутагенезом, націленим на комплементарні детермінантні групи. З метою вибору Т-клітинних рецепторів може використовуватися метод фагового дисплея (US 2010/0113300, Liddy N, Bossi G, Adams KJ, Lissina A, Mahon TM, Hassan NJ, et al. Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing. *Nat Med* 2012 Jun;18(6):980-987). З метою стабілізації Т-клітинних рецепторів у процесі фагового дисплея і у разі використання як лікарського препарату альфа- і бета-ланцюги можуть буди зв'язані ненативними дисульфідними зв'язками або іншими ковалентними зв'язками (одноланцюговий Т-клітинний рецептор) або доменами димеризації (див. Boulter JM, Glick M, Todorov PT, Baston E, Sami M, Rizkallah P, et al. Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. *Protein Eng* 2003 Sep;16(9):707-711.; Card KF, Price-Schiavi SA, Liu B, Thomson E, Nieves E, Belmont H, et al. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. *Cancer Immunol Immunother* 2004 Apr;53(4):345-357; and Willcox BE, Gao GF, Wyer JR, O'Callaghan CA, Boulter JM, Jones EY, et al. Production of soluble alphabeta T-cell receptor heterodimers suitable for biophysical analysis of ligand binding. *Protein Sci* 1999 Nov; 8 (11):2418-2423). Т-клітинний рецептор може бути зв'язаний з токсинами, лікарськими препаратами, цитокінами (див. заявку США 2013/0115191), доменами, що залучають ефекторні клітини, такі як домени антитіл проти CD3 тощо, щоб виконувати конкретні функції на клітинах-мішенях. Більш того, він може експресуватися у Т-клітинах, що використовуються для адаптивного переносу.

Додаткову інформацію можна знайти у заявках WO 2004/033685A1 і WO 2004/074322A1. Комбінація ТКР описана у заявці WO 2012/056407A1. Інші способи отримання розкриті у заявці WO 2013/057586A1.

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

Щоб вибрати надмірно презентовані пептиди, був розрахований профіль презентації, який дозволяє оцінити медіану презентації у зразку, а також варіацію повторних вимірів. Профіль зіставляє зразки пухлин різних типів, що вивчаються, з фоновим рівнем зразків нормальних тканин. Кожний із цих профілів можна потім консолідувати у показник надмірної презентації, підрахувавши р-значення за допомогою лінійної моделі змішаних ефектів (J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, Sarkar D., R Core team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. 2008), з поправкою на багаторазове тестування за методом оцінки долі хибних відхилень (Y. Benjamini and Y. Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, Vol.57 (No.1):289-300, 1995).

З метою ідентифікації і відносного кількісного визначення лігандів HLA методом мас-спектрометрії молекули HLA зразків тканин після шоквої заморозки були очищені, і були виділені пептиди, що зв'язуються з молекулами HLA. Виділені пептиди були розділені, а їх послідовності були ідентифіковані методом іонізації у наноелектроспреї при даному часі утримання в поєднанні з рідинною хроматографією і мас-спектрометричним детектуванням (PX-MS). Отримані пептидні послідовності були перевірені порівнянням шаблону фрагментації

природних TUMAP, записаного для зразків НДРЛ, із шаблонами фрагментації відповідних синтетичних контрольних пептидів із ідентичними послідовностями. Оскільки було безпосередньо виявлено, що пептиди є лігандами молекул HLA первинних пухлин, ці результати надали прямі докази природного процесингу і презентації ідентифікованих пептидів на тканинах первинних пухлин, отриманих від пацієнтів, хворих на НДРЛ.

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

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

Комплекси HLA-пептид, отримані з 50 зразків тканин пухлин НДРЛ після шокової заморозки, були очищені, і пептиди, зв'язані з молекулами HLA, були виділені і проаналізовані методом PX-MC.

Усі досліджувані TUMAP були за допомогою цього підходу ідентифіковані на зразках пухлин первинного НДРЛ, що підтвердило факт їх презентації на клітинах первинного НДРЛ.

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

Отже, цей винахід стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або його варіанту, який принаймні на 90 % гомологічний (переважно ідентичний) послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або його варіанту, який індукує перехресну реакцію Т-клітин зі згаданим пептидом, де згаданий пептид не є повнорозмірним поліпептидом.

Цей винахід стосується також пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або його варіанту, який принаймні на 90 % гомологічний (переважно ідентичний) послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину від 8 до 100, переважно від 8 до 30, і найбільш переважно від 8 до 14 амінокислот,

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

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид складається або по суті складається з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92.

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

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид є злитим білком, зокрема злитим із N-термінальними амінокислотами HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii), або де пептид є злитим із антитілом (або злитим із послідовністю антитіла), наприклад, із антитілом, що є специфічним до дендритних клітин.

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

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

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

Цей винахід також стосується пептиду за цим винаходом, нуклеїнової кислоти за цим винаходом або вектору експресії за цим винаходом для застосування в медицині.

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

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

10 Цей винахід також стосується клітини-хазяїна за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина є дендритною клітиною.

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

15 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 антиген-презентуючої клітини протягом періоду часу, достатнього для активації згаданого ЦТЛ шляхом набуття ним специфічності до антигену, де згаданий антиген є будь-яким із пептидів за цим винаходом.

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

25 Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина містить вектор експресії, здатний експресувати згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65 і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або згаданий варіант амінокислотної послідовності.

30 Цей винахід також стосується активованих цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ), отриманих згідно способу за цим винаходом, які селективно розпізнають клітину, яка абераантно експресує поліпептид, що містить описану амінокислотну послідовність.

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

35 Цей винахід також стосується застосування будь-якого пептиду за цим винаходом, нуклеїнової кислоти за цим винаходом, вектору експресії за цим винаходом, клітини за цим винаходом або активованого цитотоксичного Т-лімфоцита за цим винаходом як лікарського засобу або в процесі виробництва лікарського засобу.

40 Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де лікарський засіб являє собою вакцину.

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

45 Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де згадані ракові клітини є клітинами ракової пухлини легенів, клітинами раку шлунка, шлунково-кишкового тракту, товстої і прямої кишки, підшлункової залози або клітинами раку нирки.

Цей винахід також стосується конкретних маркерних білків і біомаркерів, які можуть використовуватися при визначенні прогнозу при раку легенів.

Крім цього, цей винахід також стосується застосування цих нових мішеней, розкритих відповідно до цього винаходу, для лікування раку.

50 Термін "антитіло" або "антитіла" використовується в тут у широкому сенсі і включає як поліклональні, так і моноклональні антитіла. На додаток до інтактних або "повнорозмірних" молекул імуноглобуліну, до терміну "антитіла" також входять фрагменти або полімери цих молекул імуноглобуліну і гуманізовані версії молекул імуноглобуліну, за умови, що вони виявляють будь-які з бажаних властивостей (наприклад, специфічне зв'язування

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

60 За найменшої можливості антитіла за винаходом слід заповувати 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 легенів, 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 ABCA13, MMP12, DST, MXRA5, CDK4, HNRNPH, TANC2, 1RNF213, SMYD3 і SLC34A2, або будь-який інший поліпептид із послідовністю від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або його фрагмент, може експресуватися в прокаріотичних клітинах (наприклад, бактерій) або еукаріотичних клітинах (наприклад, клітинах дріжджів, комах або ссавців), після чого рекомбінантний білок можна очистити і використати для отримання препарату моноклональних або поліклональних антитіл, які специфічно зв'язують поліпептидний маркер раку легенів, що використовується для отримання антитіл за винаходом.

Фахівцю в цій галузі відомо, що отримання двох або більше комплектів моноклональних або поліклональних антитіл максимально збільшує ймовірність отримання антитіла, що буде мати 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, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, new 2<sup>nd</sup> edition 2013). Наприклад, антитіла можуть бути досліджені методами ELISA, Вестерн-блотингу, імуногістохімічним забарвлюванням фіксованих формаліном зрізів тканини раку легенів або заморожених зрізів тканини. Після попередніх досліджень *in vitro* антитіла, які мають використовуватися для терапевтичних цілей або для діагностики *in vivo*, досліджують з використанням відомих методів клінічного дослідження.

Термін "моноклональне антитіло" в тому виді, в якому він використовується тут, означає антитіло, отримане із по суті гомогенної популяції антитіл, тобто, індивідуальні антитіла, що складають популяцію, є ідентичними, за винятком мутантних форм, що спостерігаються в природі, які можуть бути присутніми в незначній кількості. Моноклональні антитіла за цим патентом конкретно включають "химерні" антитіла, у яких частина важкого і (або) легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих із окремого виду, або які належать до окремого класу чи підкласу антитіл, в той час як решта ланцюга (ланцюгів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих із іншого виду або які належать до іншого класу чи підкласу антитіл, а також фрагментів таких антитіл, за умови, що вони виявляють бажану антагоністичну активність (Пат. США 4 816 567, включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті).

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

Моноклональні антитіла можуть також бути створені технологіями рекомбінантних ДНК, такими як описані в патенті США 4816567. ДНК, що кодує моноклональні антитіла за винаходом, можна легко виділити і секвенувати з використанням традиційних методик (наприклад, використовуючи олігонуклеотидні зонди, здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіл миші).

Методи *in vitro* також придатні для створення одновалентних антитіл. Розщеплення антитіл з метою отримання їх фрагментів, зокрема, Fab-фрагментів, можна провести з використанням стандартних методик, відомих у галузі. Наприклад, розщеплення можна виконати за допомогою папаїну. Приклади розщеплення за допомогою папаїну описані у заявці WO 94/29348 від 22 грудня 1994 р. і в патенті США 4342566. При розщепленні антитіл за допомогою папаїну, як правило, утворюються два ідентичних антиген-зв'язувальних 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 перехресно 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



дисульфідного зв'язування, підвищити біологічну довговічність, змінити секреторні властивості тощо. У будь-якому випадку, фрагмент антитіла має виявляти біологічну активність, таку як зв'язувальна активність, регулювання зв'язування у зв'язувальному домені тощо. Функціональні або активні центри антитіла можуть бути ідентифіковані шляхом мутагенезу конкретної ділянки білка, який супроводжується експресією і перевіркою експресованого поліпептиду. Такі методи є цілком очевидними для фахівця у цій галузі і можуть включати сайт-специфічний мутагенез нуклеїнової кислоти, що кодує фрагмент антитіла.

Антитіла за винаходом можуть додатково включати гуманізовані антитіла або людські антитіла. Гуманізованими формами антитіл нелюдського походження (наприклад, мишачі) є химерні імуноглобуліни, ланцюги імуноглобулінів або їх фрагменти (такі як Fv, Fab, Fab' 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 амінокислотних залишків, введених в нього з джерела, яке є нелюдського походження. Ці амінокислотні залишки нелюдського походження часто називають "імпортними" залишками, які зазвичай беруть із "імпортного" варіабельного домену. Гуманізацію можна по суті провести шляхом заміщення CDR або послідовностей CDR гризунів відповідними послідовностями людського антитіла. Відповідно, такі "гуманізовані" антитіла є химерними антитілами (патент США 4816567), в яких суттєво менша частина ніж інтактний варіабельний домен людини була заміщена відповідною послідовністю біологічних видів, відмінних від людини. На практиці гуманізовані антитіла є зазвичай людськими антитілами, в яких деякі залишки CDR і, можливо, залишки FR є заміщеними залишками з аналогічних сайтів антитіл гризунів.

Можуть використовуватися трансгенні тварини (наприклад, миші), які після імунізації набувають здатність продукувати повний спектр людських антитіл в умовах відсутності виробки ендогенного 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. pH 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, внутрішньочеревної, підшкірної, внутрішньом'язової) або іншими методами, такими як інфузія, яка гарантує їх доставку у кровотік у ефективній формі. Антитіла можуть також бути введені внутрішньопухлинним або перитуморальним шляхом з метою отримати місцевий, а також системний терапевтичний ефект. Кращими є місцеве або внутрішньовенне введення.

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

Оскільки маркери пухлин легенів ABCA13 і MMP12 за винаходом експресуються на високому рівні у клітинах раку легенів і експресуються на надзвичайно низькому рівні у нормальних клітинах, інгібування експресії ABCA13 і MMP12 або активності поліпептидів може бути частиною терапевтичної стратегії при лікуванні або профілактиці НДРЛ.

Принцип антисенс-терапії базується на гіпотезі, що специфічне по відношенню до послідовності пригнічення експресії генів (через транскрипцію або трансляцію) можливо досягти шляхом внутрішньоклітинної гібридизації між геномною ДНК або мРНК і комплементарними антисенсовими сполуками. Утворення такого гібридного дуплексу нуклеїнових кислот заважає транскрипції геномної ДНК, яка кодує пухлинний антиген-мішень, або процесингу/транспорту/трансляції і (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 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, наприклад, рівнях мРНК-мішені, рівнях білка-мішені і (або) рівнях активності білка-мішені.

У конкретному прикладі інгібування функції маркера пухлини легенів шляхом генної терапії з використанням антисенсових конструкцій можна досягти безпосереднім введенням суб'єкту РНК, комплементарної до маркерної РНК пухлини легенів. РНК, комплементарну до маркерної РНК пухлини, можна отримати і виділити будь-якою стандартною методикою, але найлегше його отримати транскрипцією *in vitro* з використанням ДНК, комплементарної до маркерної ДНК пухлини під контролем високоефективного промотору (наприклад, T7-промотору). Введення антисенсового РНК-маркера пухлини у клітини можна провести будь-яким методом, який застосовують для безпосереднього введення нуклеїнових кислот, як описано нижче.

Альтернативна стратегія інгібування функцій ABCA13 і MMP12 за допомогою генної терапії включає внутрішньоклітинну експресію антитіл проти ABCA13 і MMP12 або фрагментів антитіл проти ABCA13 і MMP12. Наприклад, ген (або фрагмент гену), що кодує моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з поліпептидом ABCA13 або MMP12 і інгібує його біологічну активність, ставлять під транскрипційний контроль регуляторної послідовності специфічного (наприклад, тканино- або пухлино-специфічного) гену в межах вектора експресії нуклеїнової кислоти. Вектор потім вводять суб'єкту таким чином, щоб він поглинався клітинами раку легенів або іншими клітинами, які після цього секретують антитіла проти ABCA13 і MMP12 і у такий спосіб блокують біологічну активність поліпептидів ABCA13 і MMP12. Переважно, якщо поліпептиди ABCA1 і MMP12 присутні на зовнішньоклітинній поверхні клітин раку шлунка.

У методах, що описані вище, які включають введення і поглинання екзогенної ДНК клітинами суб'єкта (наприклад, трансдукцію або трансфекцію гену), нуклеїнові кислоти за 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 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, доставки до інфікованих клітин антисенсової нуклеїнової кислоти, що інгібує експресію ABCA13 або MMP12. 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, лентівірусних 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  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  або  $^{35}\text{S}$ ), 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 ABCA13, MMP12 із 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 ABCA13 і MMP12.

Цей винахід, таким чином, стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або його варіанту, який принаймні на 90 % гомологічний послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або його варіанту, який індукує перехресну реакцію Т-клітин зі згаданим пептидом.

Пептиди за винятком здатні зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I і (або) II класу.

У цьому винаході термін "гомологічний" означає ступінь ідентичності (див. "Відсоткова ідентичність" вище) послідовностей двох амінокислотних послідовностей, тобто пептидних або поліпептидних послідовностей. Згадана вище "гомологія" визначається порівнянням двох послідовностей, що були вирівняні в оптимальних умовах щодо послідовностей, які порівнюються. Таку гомологічність послідовностей можна розрахувати, створивши вирівнювання за допомогою, наприклад, алгоритму ClustalW. Загальнодоступне програмне забезпечення для аналізу послідовностей, більш конкретно, Vector NTI, GENETYX або 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 самим пептидом (Fong et al., 2001); (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay et al., 2006).

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, в такий самий спосіб, як і пептид, що складається з даної амінокислотної послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92. Наприклад, пептид може бути модифікований так, що він буде

5 зв'язувальною щільною прийнятною молекули MHC, такої 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 цього винаходу. Як можна дізнатися з наукових публікацій

10 (Rammensee et al., 1997) і баз даних (Rammensee et al., 1999), окремі позиції пептидів, що зв'язують HLA, є типово якірними залишками, які формують ключову послідовність, що відповідає зв'язувальному мотиву рецептора HLA, який визначається полярністю, електрофізичними, гідрофобними властивостями і просторовою структурою поліпептидних ланцюгів, що утворюють зв'язувальну щільну. Отже, фахівець у цій галузі зможе модифікувати

15 амінокислотні послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, зберігаючи відомі якірні залишки, і буде здатний визначити, чи зберігають такі варіанти здатність зв'язувати молекули MHC I або II класу. Варіанти за цим винаходом зберігають здатність зв'язуватися з ТКР активованого ЦТЛ, який потім може вступати в перехресну реакцію з клітинами, які експресують поліпептид, що містить природну

20 амінокислотну послідовність спорідненого пептиду, як визначено в аспектах винаходу, або знищувати ці клітини.

Ті амінокислотні залишки, що не є 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

25 винятком зазначеної умови, пептид за винаходом може бути будь-яким пептидом (до цього терміну автори винаходу відносять олігопептид чи поліпептид), який включає амінокислотні послідовності або їхню частину чи її варіант, як він є.

Таблиця 4

Варіанти і мотив пептидів відповідно до SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 і 7

		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ABCA13-001	Код пептиду	I	L	F	E	I	N	P	K	L	
Послідовності від SEQ ID NO.	Варіанти										V
											I
											A
				M							V
				M							I
				M							
				M							A
				A							V
				A							I
				A							
				A							A
				V							V
				V							I
				V							
				V							A
				T							V
				T							I
				T							
				T							A
				Q							V
				Q							I
				Q							
				Q							A

Продовження Таблиці 4

		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MMP12-003	Код пептиду			I	Q	E	M	Q	H	F	L
SEQ ID No.	Варіанти			L							V
				L							I
				L							
				L							A
				M							V
				M							I
				M							
				M							A
				A							V
				A							I
				A							
				A							A
				V							V
				V							I
				V							
				V							A
				T							V
				T							I
				T							
				T							A
				Q							V
				Q							I
				Q							
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DST-001	Код пептиду			L	I	E	K	S	I	Y	L
SEQ ID No.	Варіанти										V
											I
											A
				M							V
				M							I
				M							
				M							A
				A							V
				A							I
				A							
				A							A
				V							V
				V							I
				V							
				V							A
				T							V
				T							I
				T							
				T							A
				Q							V
				Q							I
				Q							
				Q							A

Продовження Таблиці 4

		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MXRA5-001	Код пептиду			L	S	S	I	K	V	E	V
SEQ ID No.	Варіанти										I
											L
											A
				M							
				M							I
				M							L
				M							A
				A							
				A							I
				A							L
				A							A
				V							
				V							I
				V							L
				V							A
				T							
				T							I
				T							L
				T							A
				Q							
				Q							I
				Q							L
				Q							A
		Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CDK4-001	Код пептиду			L	W	Y	R	A	P	E	V
SEQ ID No.	Варіанти										I
											L
											A
				M							
				M							I
				M							L
				M							A
				A							
				A							I
				A							L
				A							A
				V							
				V							I
				V							L
				V							A
				T							
				T							I
				T							L
				T							A
				Q							
				Q							I
				Q							L
				Q							A

Більш довгі пептиди також можуть бути підходящими. Також можливо, щоби епітопи комплексу МНС І класу, хоча вони мають зазвичай довжину 8-11 амінокислот, утворювались шляхом процесингу з більш довгих пептидів чи білків, які включають фактичний епітоп. Бажано, щоби

бокові залишки фактичного епітопу не завдавали значного впливу на протеолітичне розщеплення, необхідне для презентації фактичного епітопу під час процесингу.

Відповідно, за цим винаходом також пропонуються пептидні епітопи і епітопи пептидних варіантів, що зв'язуються з молекулами МНС I класу, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину від 8 до 100, переважно від 8 до 30, та найбільш переважно від 8 до 14, а саме, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 амінокислот, а у випадку пептиді в, що зв'язуються з молекулами HLA II класу, вони можуть досягати такої довжини, як 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 або 33 амінокислоти.

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

У особливо переважному втіленні цього винаходу пептид складається або по суті складається з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92.

"По суті складається з" означає, що пептид за цим винаходом, на додаток до послідовності відповідно до будь якої послідовності від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92, або його варіант, містить додаткові N- і (або) C-термінальні фрагменти послідовності амінокислот, які не обов'язково утворюють частину пептиду, що функціонує як епітоп для молекул МНС.

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

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

В реверсованому пептидному зв'язку амінокислотні залишки не з'єднуються пептидними зв'язками (-CO-NH-), а пептидний зв'язок реверсується. Такі ретро-інверсивні пептидні міметики можуть бути отримані методами, відомими в даній галузі, наприклад, описаними в роботі Meziere і співавт. (1997) J. 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 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 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 NaCNBH<sub>3</sub>.

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

залишків неприродного походження. Такі заміни можуть служити для підвищення стабільності, біологічної доступності і (або) здатності до зв'язування пептидів за винаходом.

Подібним чином, пептид чи його варіант за винаходом може модифікуватися хімічно, шляхом реакції окремих амінокислот до чи після синтезу пептиду. Приклади таких модифікацій добре відомі в цій галузі та узагальнені, зокрема, в роботі R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 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 тіольними сполуками, реакцію з імідом малеїнової кислоти, карбоксиметилування йодоцтовою кислотою чи йодацетамідом та карбамоїлування ціанатом при лужному рН, хоча способи модифікації не обмежуються наведеними тут. В цьому відношенні досвідчений фахівець може звернутися до Глави 15 праці *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, аргінільних залишків часто базується на реакції віцинальних дикарбонільних сполук, таких як фенілглюксаль, 2,3-бутандіон і 1,2-циклогександіон, з утворенням адукту. Іншим прикладом є реакція метилглюксалю з аргініновими залишками. Цистеїн може бути модифікований без супутньої модифікації інших нуклеофільних сайтів, таких як лізин та гістидин. В результаті велика кількість реагентів є доступною для модифікації цистеїну. Веб-сайти таких компаній, як Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>), надають інформацію щодо конкретних реагентів.

Селективне відновлення дисульфідних зв'язків також є поширеним. Дисульфідні зв'язки можуть утворюватися і окислюватися під час теплової обробки біофармацевтичних препаратів.

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

Наприклад, діетилпірокарбонат є реагентом для модифікації гістидильних залишків у білках. Для модифікації гістидину може також використовуватися 4-гідрокси-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.

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

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

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

Пептид чи його варіант, де пептид є модифікованим або включає непептидні зв'язки, є переважним втіленням цього винаходу. Загалом, пептиди і їх варіанти (принаймні такі, що містять пептидні зв'язки між амінокислотними залишками) можуть бути синтезовані Fmoc-поліамідним методом твердофазного синтезу пептидів, як це розкрито у роботі Lu і співавт., 1981) і в посиланнях, що є в ній. Тимчасовий захист N-аміногрупи забезпечується 9-флуоренілметилоксихарбонільною (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'-диметоксибензгидрильну групу. Основою



твердофазного носія є полідиметилакриламідний полімер, що складається з трьох мономерів: диметилакриламід (каркасний мономер), біс-акрилоїлетилендіаміну (компонент для перехресного зв'язування) і акрилоїлсаркозинметилового естеру (функціоналізуючий агент). Як агент, що утворює зв'язок пептиду і смоли, який піддається розщепленню, використовується нестійке до дії кислот похідне 4-гідроксиметилфеноксистої кислоти. Всі амінокислотні похідні додають у вигляді заздалегідь синтезованих симетричних ангідридних похідних за винятком аспарагіну і глутаміну, які додають з використанням зворотної N,N-дициклогексилкарбодіімід/1-гідроксибесотриазол-опосередкованої реакції сполучення. Усі реакції сполучення і зняття захисту відслідковували за допомогою методів контролю з використанням нінгідрину, тринітробензолсульфонової кислоти і ізотину. Після завершення синтезу пептиди відщеплюють від смоли-носія з супутнім видаленням захисних груп бокових ланцюгів шляхом обробки 95 % трифтороцтовою кислотою, що містить 50 % суміші поглиначів. Зазвичай використовувані поглиначі включають етандитіол, фенол, анізол і воду, конкретний вибір залежить від амінокислотних складових пептиду, що синтезується. Для синтезу пептидів можливе також використання комбінації твердофазних і рідкофазних методик (див., наприклад (Bruckdorfer et al., 2004) і посилання, наведені в цій роботі).

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 перекристалізація, ексклюзійна хроматографія, іонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобної взаємодії та (зазвичай) зворотно-фазна 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 (ТФЕ), зворотно-фазної 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 їх комбінацією, як одноланцюговою, так і (або) дволанцюговою, або природними чи стабілізованими формами полінуклеотидів, такими як, наприклад, полінуклеотиди з фосфоротіоатним скелетом; він може містити або не містити інтрони, за умови, що він кодує пептид. Звичайно, що тільки пептиди, що містять природно існуючі амінокислотні залишки, з'єднані природно існуючими пептидними зв'язками, можуть бути кодовані полінуклеотидом. Згідно з ще одним аспектом цього винаходу, пропонується вектор експресії, здатний експресувати поліпептид відповідно до винаходу.

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

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

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

Ця ДНК (або, у випадку ретровірусного вектору, РНК) може потім експресуватися у відповідному організмі-хазяїні, утворюючи поліпептид, що містить пептид або чи його варіант за винаходом. Таким чином, ДНК, яка кодує пептид чи його варіант за винаходом, може використовуватися відповідно до відомих методик, належним чином модифікованих виходячи з

ідей, розкритих у цьому описі, для конструювання вектору експресії, який після цього використовується для трансформації відповідних клітин-хазяїв таким чином, щоб вони набули здатність експресувати і виробляти пептиди за винаходом. Ці методики включають такі, що розкриті у патентах США 4440859, 4530901, 4582800, 4677063, 4678751, 4704362, 4710463, 4757006, 4766075 і 4810648.

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

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

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

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

Фахівцям відомі багато експресійних систем, включаючи бактерії (наприклад, *E. coli* і *Bacillus subtilis*), дріжджі (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), міцеліальні гриби (наприклад, *Aspergillus* спес.), клітини рослин, тварин і комах. Переважно система може бути клітинами ссавців, таких як клітини CHO, які комерційно доступні від Колекції типових культур 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. Плазмідні вектори дріжджів pRS403, pRS404, pRS405 і pRS406 є дріжджовими інтегруючими плазмідами (YIp) і включають дріжджові селективні маркери HIS3, TRP1, LEU2 і URA3. Плазмідні pRS413-416 є дріжджовими плазмідами з центромерами (Ycp). Вектори на базі промотору CMV (наприклад, від компанії Sigma-Aldrich) забезпечують тимчасову або стабільну експресію, цитоплазматичну експресію або секрецію і N-термінальне або C-термінальне мічення для різних комбінацій FLAG, 3xFLAG, c-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) людини підвищує рівні конститутивної експресії білка у клітинах лінії COS до таких високих значень, як 1 мг/л. У разі не таких активних ліній клітин рівні білка зазвичай становлять ~0,1 мг/л. Присутність ділянки початку реплікації у фрагменті SV40 приводить до високих рівнів реплікації ДНК у пермісивних клітинах COS. Вектори CMV, наприклад, можуть містити pMB1 (похідне pBR322) ділянку початку реплікації у клітинах бактерій, ген бета-лактамази для вибору резистентності бактерій до ампіциліну, poly(A) гормону росту людини і ділянку початку реплікації f1. Вектори, що містять лідерну послідовність препротрипсину (PPT), можуть направляти секрецію злитих білків FLAG в культуральному середовищі на очищення антитіл проти FLAG, смол і пластинок. Інші вектори і експресійні системи також добре відомі у цій галузі для використанні у багатьох клітинах-хазяїнах.

В іншому втіленні два або більше пептидів або варіантів пептидів за винаходом кодуються і, отже, експресуються послідовно (подібно до конструкцій "вузли на мотузці"). При цьому пептиди або варіанти пептидів можуть бути зв'язані або злиті одне з одним фрагментами лінкерних амінокислотних послідовностей, такими, наприклад, як LLLLLL, або можуть зв'язатися без будь-яких додаткових пептидів між ними.

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

Трансформація відповідних клітин-хазяїв за допомогою ДНК-конструкції за цим винаходом здійснюється добре відомими методами, вибір яких, як правило, залежить від типу вектора, що використовується. Щодо трансформації прокаріотичних клітин-хазяїв див., наприклад, Cohen 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 і (або) трансфекції клітин і відома в цій галузі як метод трансформації клітин дріжджів, клітин бактерій, клітин комах і клітин хребетних.

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

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

У переважному втіленні клітина-хазяїн є антиген-презентуючою клітиною, зокрема, дендритною клітиною або антиген-презентуючою клітиною. Зараз проводиться дослідження застосування для лікування раку передміхурової залози АПК, навантажених рекомбінантним злитим білком, що містить простатичну кислоту фосфатазу (Sipuleucel-T) (Small et al., 2006; Rini et al., 2006).

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

В іншому втіленні пептид, нуклеїнова кислота або вектор експресії за винаходом застосовуються у медицині. Наприклад, пептид або його варіант може бути приготований для внутрішньовенного (в/в) введення, підшкірного (п/ш) введення, внутрішньошкірного (в/ш) введення, внутрішньочеревного (в/ч) введення, внутрішньом'язового (в/м) введення. Переважні способи введення пептиду – це п/ш, в/ш, в/ч, в/м і в/в. Переважними способами введення ДНК є в/ш, в/м, п/ш, в /ч і в/в. Можуть вводиться дози від 50 мкг до 1,5 мг, переважно від 125 мкг до 500 мкг пептиду або ДНК залежно від відповідного пептиду чи ДНК. Дози в цьому діапазоні успішно використовувались в попередніх дослідженнях (Walter et al Nature Medicine 18, 1254-1261 (2012)).

Згідно з іншим аспектом цього винаходу пропонується спосіб отримання активованих Т-клітин *in vitro*, причому спосіб включає контактування *in vitro* Т-клітин із навантаженими антигеном молекулами МНС, що експресуються на поверхні відповідної антиген-презентуючої клітини протягом періоду часу, достатнього для активації Т-клітини шляхом набуття нею

специфічності до антигену, де згаданий антиген є пептидом за винаходом. Переважно з антиген-презентуючою клітиною використовують достатню кількість антигену.

Переважно клітина ссавців не має пептидного транспортера TAP чи має його знижений рівень або знижену функціональну активність. Відповідні клітини з дефіцитом пептидного транспортера TAP включають клітини T2, RMA-S і клітини дрозоділі. TAP є транспортером, асоційованим із процесингом антигену.

Лінія клітин людини, у яких недостатньо T2 і на які 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 дрозоділі 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 MHC I класу/ Також переважно клітина-стимулятор експресує молекулу, яка є важливою для забезпечення додаткового стимулюючого сигналу для T-клітин, таку як будь-яка з молекул B7.1, B7.2, ICAM-1 і LFA 3. Послідовності нуклеїнових кислот багатьох молекул MHC I класу і коstimуляторних молекул є у вільному доступі в базах даних GenBank і EMBL.

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

Якщо антиген-презентуюча клітина трансфекують для експресії такого епітопу, клітина переважно містить вектор експресії, здатний експресувати пептид, що містить послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO. 84, і SEQ ID NO 92, або варіант його амінокислотної послідовності.

Ряд інших способів може використовуватися для отримання ЦТЛ *in vitro*. Наприклад, спосіб, 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 шляхом обробки дендритних клітин пептидом або поліпептидом або інфікуванням рекомбінантним вірусом. Hill і співавт., (1995) і Jerome і співавт., (1993) використовували B-клітини для отримання аутологічних ЦТЛ. Крім того, для отримання аутологічних ЦТЛ можуть використовуватися макрофаги, оброблені пептидом або поліпептидом або інфіковані рекомбінантним вірусом. S. Walter і співавт., 2003, описують примування T-клітин *in vitro* за допомогою штучних антиген-презентуючих клітин (штучні АПК), що також є прийнятним способом отримання T-клітин проти вибраного пептиду. В цій роботі штучні АПК отримували шляхом прикріплення заздалегідь сформованих комплексів MHC-пептид до поверхні полістирольних частинок (мікрогранул) за допомогою системи біотин-стрептавідин. Ця система забезпечує точний контроль щільності MHC на штучних АПК, що дозволяє селективно викликати високо- або низькоавідні специфічності до антигену відповіді T-клітин з високою ефективністю для зразків крові. Окрім комплексів MHC-пептид, штучні АПК мають нести інші білки з коstimулявальною 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 T-клітин, і відповідний спосіб описаний детально у заявці WO 97/26328, яка включена в цей документ шляхом посилання. Наприклад, окрім клітин дрозоділі 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 T-лімфоцити, які спрямовані проти пептидів за винаходом, є корисними в терапії. Отже, згідно з ще одним аспектом винаходу пропонуються активовані T-клітини, які можна отримати за допомогою вищезгаданих способів за винаходом.

Активовані T-клітини, які отримані вищезгаданим способом, селективно розпізнають клітину, яка абераантно експресує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність від No. 1 до SEQ ID NO 92, переважно послідовність від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID NO 92.

Переважно T-клітина розпізнає цю клітину шляхом взаємодії свого T-клітинного рецептору з комплексом HLA/пептид (наприклад, зв'язуванням). T-клітини є корисними у способі 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, не страждає від якогось захворювання, на яке її можна легко перевірити і виявити.

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

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

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

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

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

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 те, що клітини уникають імунної відповіді. Таким чином, будь-яка молекула за цим винаходом може застосовуватися як лікарський засіб або в процесі виробництва лікарського засобу. Згадана молекула може використовуватися сама по собі або у комбінації з іншою молекулою (іншими молекулами) за винаходом або відомою молекулою (відомими молекулами).

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

Згідно з одним аспектом винаходу, вакцина містить принаймні один пептид, який має амінокислотну послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 92, і принаймні один додатковий пептид, переважно, від двох до 50, більш переважно, від двох до 25, ще більш переважно, від двох до 20, і найбільш переважно, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять, п'ятнадцять, шістнадцять, сімнадцять або вісімнадцять пептидів. Пептид(и) може (можуть) бути виділений (виділені) з одного або більшої кількості специфічних ТАА і може (можуть) зв'язатися з молекулами МНС I класу.

В іншому аспекті винаходу вакцина містить принаймні один пептид, який має амінокислотну послідовність від SEQ ID NO 1 до SEQ ID NO 65, і від SEQ ID NO 76 до SEQ ID NO 84, і SEQ ID

NO 92, і принаймні один додатковий пептид, переважно, від двох до 50, більш переважно, від двох до 25, ще більш переважно, від двох до 20, і найбільш переважно, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять, п'ятнадцять, шістнадцять, сімнадцять або вісімнадцять пептидів. Пептид(и) може (можуть) бути виділений (виділені) з одного або більшої кількості специфічних TAA і може (можуть) зв'язатися з молекулами МНС I класу.

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

Лікарський засіб за винаходом може також включати один або більше ад'ювантів. Ад'юванти є речовинами, які у неспецифічний спосіб підвищують або підсилюють імунну відповідь (наприклад, імунну відповідь на антиген, яку опосередковують ЦТЛ і Т-хелпери (T<sub>H</sub>), і, отже, можуть вважатися корисними для використання у лікарському засобі за винаходом. Відповідні ад'юванти включають, але не обмежуються ними, 1018 ISS, солі алюмінію, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, флагелін чи ліганди TLR5, які походять з флагеліну, ліганд FLT3, 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 and Krummel, 1995; Allison and Krummel, 1995). Також можуть застосовуватися цитокіни. Окремі цитокіни були прямо співвіднесені з впливом на міграцію дендритних клітин до лімфоїдних тканин (наприклад, TNF-α), прискорюючи дозрівання дендритних клітин до ефективних антиген-презентуючих клітин для Т-лімфоцитів (наприклад, GM-CSF, ІЛ-1 та ІЛ-4) (Патент США 5 849 589, конкретно включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті) та діючі як імуноад'юванти (наприклад, ІЛ-12, ІЛ-15, ІЛ-23, ІЛ-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 TLR9. Активація TLR9, ініційована CpG, посилює антиген-специфічні гуморальні та клітинні реакції на широкий спектр антигенів, включаючи пептидні чи білкові антигени, живі або знищені віруси, вакцини на основі дендритних клітин, аутологічні клітинні вакцини та полісахаридні кон'югати як в профілактичних, так і в терапевтичних вакцинах. Важливішим є те, що посилюється визрівання та диференціація дендритних клітин, що в результаті збільшує активацію T<sub>H1</sub>-клітин та інтенсивну генерацію цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) навіть за відсутності підтримки з боку CD4 Т-клітин. Активація T<sub>H1</sub>, індукована стимуляцією TLR9, зберігається навіть у присутності вакцинних ад'ювантів, таких як галун чи неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), які зазвичай сприяють активації T<sub>H2</sub>. CpG-олігонуклеотиди демонструють навіть більшу ад'ювантну активність, коли переводяться в лікарську форму або вводяться разом з іншими ад'ювантами чи в таких формах, як мікрочастинки, наночастинки, ліпідні емульсії або подібні композиції, особливо необхідні для індукування сильної відповіді, коли антиген відносно слабкий. Вони також прискорюють імунну відповідь та дозволяють зменшити дози антигену приблизно на два порядки в порівнянні з відповідями антитіл на

вакцину в повній дозі без CpG, як спостерігалось в деяких експериментах (Krieg, 2006). В патенті США 6 406 705 B1 описується комбіноване застосування CpG-олігонуклеотидів, ад'ювантів, що не містять нуклеїнові кислоти, та антигену для індукування антиген-специфічної імунної відповіді. CpG TLR9-антагоністом є dSLIM (імуномодулятор із структурою типу

5 дволанцюжкове стебло-петля) компанії Mologen (Берлін, Німеччина), який є переважним компонентом фармацевтичної композиції за цим винаходом. Також можуть використовуватись інші TLR-зв'язувальні молекули, наприклад, TLR 7, TLR 8 і (або) TLR 9, що зв'язуються 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®, Hiltanol®, полі-(ICLC), полі(IC-R), полі(I:C12U), бактеріальні ДНК або РНК, відмінні від CpG, а також невеликі імунологічно активні молекули та антитіла, такі як циклофосфамід, сунітиніб, бевацизумаб, целебрекс, NCX-4016, сілденафіл, тадалафіл, варденафіл, сорафеніб, темозоломід, темзиролімум, XL-999, CP-547632, пазопаніб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4, інші антитіла, націлені на ключові структури імунної системи (наприклад, анти-CD40-

15 анти-TGFбета-, анти-TNFальфа-рецептори) та SC58175, які можуть діяти терапевтично і (або) як ад'юванти. Кількості та концентрації ад'ювантів та добавок, прийнятих в контексті цього винаходу, можуть бути легко визначені досвідченим фахівцем без зайвого експериментування.

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

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

25 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), циклофосфамід, іміквімод і резиквімод.

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

Навіть більш переважними ад'ювантами є монтанід IMS 1312, монтанід ISA 206, монтанід ISA 50V, монтанід ISA-51, полі-ICLC (Hiltanol®) і анти-CD40 mAb або їх комбінація.

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 носіїві. Крім того, композиція може містити допоміжні речовини, такі як буфери, зв'язувальні агенти, розпушувачі, розріджувачі, ароматизатори, антифрикційні речовини тощо. Пептиди можна також ввести разом із імуностимуляторами, такими як цитокіни. Великий перелік допоміжних речовин, які можна використовувати у такій композиції, можна знайти, наприклад, у книзі A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> Ed. 2000, вид. "American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press". Ця композиція може застосовуватися для попередження, профілактики і (або) лікування аденоматозних або ракових захворювань. Приклади фармацевтичних композицій наведені в EP2113253.

45 Тим не менш, залежно від кількості і фізико-хімічних характеристик пептидів за винаходом, необхідно проводити подальші дослідження, щоб отримати фармацевтичні композиції для конкретних комбінацій пептидів, особливо комбінацій із більш ніж 20 пептидів, стабільних протягом більш ніж 12–18 місяців.

Предметом цього винаходу є лікарський засіб, який може застосовуватися при лікуванні раку, зокрема, недрібноклітинного раку легень, раку шлунка, нирково-клітинної карциноми, раку товстої кишки, 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;

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

(c) необов'язково, інструкції з (i) застосування розчину або (ii) відновлення і (або) застосування ліофілізованої композиції.

Комплект може додатково включати один або більше (iii) буферів, (iv) розріджувачів, (v) фільтрів, (vi) голок або (vii) шприців. Контейнер є переважно пляшкою, флаконом, шприцом або

пробіркою; і він може бути контейнером багаторазового застосування. Фармацевтична композиція є переважно ліофілізованою.

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

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

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

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

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

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

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

Оскільки пептиди за винаходом були виділені з тканин НДРЛ, лікарський засіб за винаходом переважно застосовується для лікування НДРЛ. У переважному втіленні, оскільки пептиди за винаходом, які походять з ABCA13 і MMP12, були виділені з тканин НДРЛ, лікарський засіб за винаходом переважно застосовується для лікування НДРЛ.

Пептиди з послідовностями від SEQ ID NO 78 до 92 були також виділені з клітин карциноми Меркеля, і, таким чином, можуть застосовуватись для лікування карциноми з клітин Меркеля.

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

Короткий опис ілюстрацій

Фігура 1: Типовий мас-спектр ABCA13-001, що демонструє його презентацію на зразку 898 первинної пухлини НДРЛ. Дослідження за допомогою РХ-МС із системою іонізації у наноелектроспреї було проведено на пулі пептидів, що був елюований із зразка 898 пухлини



НДРЛ. Мас-хроматограма для  $m/z$  543,8318 $\pm$ 0,001 Да,  $z=2$  містить пік пептидів із часом утримання 86,36 хв. В). Виявлений пік на мас-хроматограмі при 86,36 хв. відповідає сигналу для  $m/z$  543,8318 на МС спектрі. С) Мас-спектр з індукованою зіткненнями дисоціацією вибраного прекурсора з  $m/z$  543,8318, записаний в експерименті на РХ-МС системі іонізації у наноелектроспреї при даному часі утримання, підтвердив присутність ABCA13-001 у зразку 898 пухлини НДРЛ. D) Був записаний шаблон фрагментації синтетичного контрольного пептиду ABCA13-001. Було проведене його порівняння з отриманим шаблоном фрагментації природного TUMAP, наведеним на фіг. С для верифікації послідовності.

Фігура 2: Профілі експресії мРНК вибраних білків в нормальних тканинах і в 21 зразку тканин раку легенів

a) ABCA13 (Ідентифікатор набору проб: 1553605\_a\_at)

b) MMP12 (Ідентифікатор набору проб: 204580\_at)

Фігура 3: Профілі презентації для вибраних пептидів, зв'язаних з молекулами HLA I класу. Профілі презентації були розраховані для кожного пептиду, які дозволяють оцінити середній рівень презентації у зразку, а також варіацію повторних вимірів. Профіль зіставляє зразки пухлини, що вивчається, з фоновим рівнем зразків нормальних тканин.

a) ABCA13-001

b) DST-001

c) MXRA5-001

Фігура 4: Типові результати для пептид-специфічної імуногенності in vitro для TUMAP, що утворюють комплекси з молекулами HLA I класу. Специфічні Т-клітини CD8+ були забарвлені мультимерами HLA, до яких приєднані два різні флуорохроми. На гістограмах відображені популяції клітин з позитивним забарвлюванням обома барвниками, зв'язаними з МНС-мультимерами, для стимуляції пептиду (ліві панелі) і стимуляції відповідних пептидів негативного контролю (праві панелі).

Фігура 5: Зв'язувальні властивості POSTN-002 і MMP12-002 по відношенню до досліджуваних гаплотипів HLA. На діаграмі наведені показники зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з HLA-DR п'ятьох з 7 проаналізованих гаплотипів.

Фігура 6: Стабільність комплексів HLA-POSTN-002 і MMP12-002 після витримки протягом 24 годин за температури 37 °C: На діаграмі показані відсоткові долі інтактних комплексів HLA-POSTN-002 і HLA-MMP12-002 після витримки з відповідними молекулами HLA протягом 24 годин за температури 37 °C:

Фігура 7: Приклад відповіді Т-клітин CD4+ на введення вакцини проти CEA-006, виявленої методом внутрішньоклітинного забарвлювання цитокінів класу II. Після сенсibiliзації in vitro були проаналізовані МКПК пацієнта 36-031 на відповідь Т-клітин CD4+ на CEA-006 (верхня панель) і на імітатор (нижня панель) у пулі часових точок В8/В3Д. Клітини стимулювали відповідними пептидами і забарвлювали для визначення життєздатності, антитіл проти CD3, CD8, CD4 і ефекторних маркерів (справа наліво: CD154, TNF-альфа, IFN-гама, IL-2, IL-10), відповідно. Життєздатні Т-клітини CD4 аналізували щодо долі клітин, позитивних по відношенню до однієї або кількох ефекторних молекул.

Фігура 8: Імуногенність різних пептидів у комплексі з молекулами HLA II класу: На діаграмі наведені показники імунної відповіді на 5 різних пептидів у комплексі з молекулами HLA II класу, виявлених у 16 пацієнтів для пептидів IMA950 і у 71 пацієнта для пептидів IMA910 методом внутрішньоклітинного забарвлювання цитокінів.

## ПРИКЛАДИ

### ПРИКЛАД 1:

Ідентифікація і кількісне визначення рівнів пухлино-асоційованих пептидів, презентованих на поверхні пухлин

Зразки тканин

Клітини пухлин пацієнтів були надані Гейдельберзьким університетом, Гейдельберг, 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.

Виділення пептидів 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.T1999) з використанням HLA-A\*02-специфічного антитіла BB7.2, використанням HLA-A, -B, -C-специфічного антитіла W6/32, використанням CNBr-активованої сефарози, кислотної обробки та ультрафільтрації.

Методи

Одержані пули пептидів HLA розділялися відповідно до їхньої гідрофобності із використанням зворотно-фазної хроматографії (Acquity UPLC system, Waters), та елюювані пептиди були проаналізовані на гібридному мас-спектрометрі LTQ-Orbitrap (ThermoFisher) з джерелом іонів типу електроспрей (ESI). Пептидні пули були завантажені безпосередньо на аналітичну мікрокапілярну колонку з плавленого кварцу (75 мкм в.д. x 250 мм), заповнену зворотно-фазним сорбентом C18 розміром 1,7 мкм (Waters), із застосуванням швидкості потоку 400 нл на хвилину. Згодом пептиди були розділені з використанням двоетапного 180-хвилинного бінарного градієнту з 10 % до 33 % розчинника В при швидкості потоку 300 нл на хвилину. Градієнт був забезпечений розчинником А (0,1 % мурашиної кислоти у воді) та розчинником В (0,1 % мурашиної кислоти в ацетонітрилі). Був використаний скляний капіляр із золотим покриттям (PicoTip, New Objective) для введення в джерело іонів нано-ESI. Мас-спектрометр LTQ-Orbitrap працював в інформаційно-залежному режимі з використанням стратегії TOP5. Стисло, цикл сканування був ініційований з повним скануванням при високій точності маси на Orbitrap (R=30000) 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 програмою SEQUEST з додатковим контролем в ручному режимі. Ідентифікована пептидна послідовність була підтверджена порівнянням генерованої моделі фрагментації природного пептиду з моделлю фрагментації синтетичного контрольного пептиду з ідентичною послідовністю. На Фігурі 1 показаний зразок спектру, одержаний на пухлинній тканині для пептиду ABCA13-001, асоційованого з MHC I класу, та його профіль елюції на системі UPLC.

Відносно кількісне визначення на основі даних PX-MC без використання ізотопної мітки здійснювалось підрахунком іонів, тобто екстракцією і аналізом компонентів PX-MC (Mueller і співавт. 2007a). Цей метод базується на припущенні, що площі піків PX-MC сигналів пептиду корелюють з його кількістю у зразку. Екстраговані компоненти були потім піддані обробці методами деконволюції за зарядовими станами і вирівнювання часу утримання (Mueller і співавт. 2007b; Sturm і співавт. 2008). Нарешті, компоненти PX-MC були піддані обробці методом перехресних посилення з результатами ідентифікації послідовностей з метою об'єднати кількісні дані різних зразків і тканин у профілі презентації пептидів. Кількісні дані пройшли двоярусну нормалізацію відповідно до основної тенденції, з урахуванням варіабельності технічних і біологічних повторних вимірів. Отже, кожний ідентифікований пептид можна зв'язати з кількісними даними, що дозволяє провести відносний кількісний аналіз між зразками і тканинами. Крім того, усі кількісні дані, отримані для пептидів-кандидатів, були перевірені вручну для забезпечення погодженості даних і перевірки точності автоматичного аналізу. Профілі презентації були розраховані для кожного пептиду, які дозволяють оцінити середній рівень презентації у зразку, а також варіацію повторних вимірів. Профіль зіставляє зразки пухлин НДРЛ з фоновим рівнем зразків нормальних тканин.

Профілі презентації прикладів надмірно презентованих пептидів показані на Фігурі 3.

## 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, які надмірно експресуються на клітинах пухлин у порівнянні з більшістю нормальних тканин.

Ідеальний пептид одержують з білка, що є унікальним для пухлини і не присутній у будь-якій іншій тканині. Щоб ідентифікувати пептиди, які 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.

## Джерела та приготування РНК

Зразки тканин, видалені хірургічним шляхом, були надані Гейдельберзьким університетом, Гейдельберг, Німеччина (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. Тотальна РНК була приготована з цих зразків з використанням реактиву TRI (Ambion, Дармштадт, Німеччина), з наступним очищенням за допомогою RNeasy (QIAGEN, Хільден, Німеччина); обидві методики виконувались за протоколом виробника.

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

5 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 тотальної РНК, з використанням SuperScript RTII (Invitrogen) та оліго-dT-T7-праймеру (MWG Biotech, Еберсберг, Німеччина), як описано в посібнику. Транскрипція *in vitro* була виконана з використанням комплексу маркування РНК-транскриптів BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фармінгем, 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 нормалізації були застосовані 100 службових генів, наданих компанією Affymetrix. Відносні значення експресії були розраховані по відношенням логарифмів зареєстрованих сигналів, наданим комп'ютерною програмою, причому значення для нормального зразка тканин нирки було довільно встановлене на 1,0.

Типові профілі експресії вихідних генів цього винаходу, які в значній мірі надмірно експресуються у недрібноклітинній карциномі легенів, показані на Фігурі 2.

#### ПРИКЛАД 4

Імуногенність *in vitro* презентованих МНС I класу пептидів, специфічних до НДРЛ

30 Щоб отримати інформацію стосовно імуногенності TUMAP за цим винаходом, автори цього винаходу провели дослідження з використанням примування Т-клітин *in vitro* на основі повторної стимуляції Т-клітин CD8+ штучними антиген-презентуючими клітинами (штучними АПК), навантаженими комплексами пептид/МНС і антитілами проти CD28. У такий спосіб була показана імуногенність на цей час дев'яти TUMAP за цим винаходом, рестрикованих за HLA-A\*0201, що продемонструвало, що ці пептиди є епітопами Т-клітин, проти яких в організмі людини існують попередники Т-клітин CD8+ (Таблиця 4).

Примування Т-клітин CD8+ *in vitro*

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

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

Приготування мікрогранул, покритих рМНС і антитілами проти CD28, стимуляція Т-клітин та зчитування виконувалися у добре вивченій системі *in vitro* з використанням чотирьох різних молекул рМНС для кожної стимуляції і 8 різних молекул рМНС для кожної умови зчитування.

55 Усі комплекси з рМНС, які використовуються для завантаження штучних АПК і зчитування даних цитометрії, були отримані за допомогою УФ-індукованого обміну МНС-лігандами (Rodenko et al., 2006) з невеликими модифікаціями. Для визначення кількості мономеру рМНС, отриманого обміном, був проведений аналіз з використанням сендвіч-варіанту ELISA із препаратами стрептавідину відповідно до (Rodenko et al., 2006).

60 Очищені коштамулювальні антитіла мишачого IgG2a проти CD28 людини Ab 9.3 (Jung et al., 1987) були хімічно біотинільовані за допомогою сульфо-N-гідроксисукцинімідобіотину, як

рекомендовано виробником (Perbio, Бонн, Німеччина). Використовували полістирольні гранули діаметром 5,6 мкм, покриті стрептавідином (Bangs Laboratories, Ілінойс, США).

pMHC, використаними як позитивний і негативний контроль, були A\*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV з модифікованого Melan-A/MART-1) та A\*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI з DDX5), відповідно.

В 96-лункові планшети вносили 800000 мікрогранул/200 мкл у присутності  $4 \times 12,5$  нг різних біотинільованих комплексів pMHC, промивали та додавали 600 нг біотинільованих антитіл проти CD28 в об'ємі 200 мкл. Стимуляцію проводили в планшетах на 96 лунок шляхом спільного інкубування  $1 \times 10^6$  Т-клітин CD8+ із  $2 \times 10^5$  промитих мікрогранул з покриттям у 200 мкл TCM з доданням 5 нг/мл ІЛ-12 (PromoCell) протягом 3-4 днів при 37 °С. Половина середовища була потім замінена свіжим TCM з доданням 80 Од/мл ІЛ-2, а інкубування тривало 3-4 дні при 37 °С. Цей цикл стимуляцій був виконаний загалом три рази. Для зчитування з pMHC-мультимерів з використанням 8 різних молекул pMHC для кожної умови зчитування застосовувалося двомірне структурне кодування як описано раніше (Andersen et al., 2012) з невеликими модифікаціями, які стосуються зв'язування з п'ятьма різними флуорохромами. Нарешті, був проведений аналіз мультимерів за допомогою забарвлювання клітин барвником для визначення їхньої життєздатності Live/dead у ближньому ІК-діапазоні (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина), клона антитіл CD8-FITC SK1 (BD, Гейдельберг, Німеччина) і флуоресцентних pMHC-мультимерів. Для аналізу використовували цитометр BD LSRII SORP, обладнаний відповідними лазерами і фільтрами. 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 визначено 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 Т-клітини CD8+ після стимуляції in vitro (тобто, коли ця лунка містила хоча б 1 % специфічних мультимер-позитивних серед Т-клітин CD8+ та процент специфічних мультимер-позитивних клітин був принаймні в 10 разів більше медіанного значення стимуляцій відповідних негативних контролів).

Імуногенність in vitro для пептидів НДРЛ

Для перевірених пептидів HLA I класу імуногенність in vitro можна продемонструвати генерацією пептидо-специфічних Т-клітинних ліній Типові результати цитометрії після TUMAP-специфічного мультимерного забарвлення для двох пептидів за винаходом показані на Фігурі 4, разом із відповідними негативними контролями Результати для 25 пептидів за винаходом зведені у Таблицю 5 Імуногенність in vitro пептидів HLA класу I за винаходом

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

Таблиця 5

SEQ ID NO:	Лунки	Донори
1	+	++
2	+	++
3	+	++
4	+	++
7	++	++++
8	+	++
9	+	+
10	+	++
11	++	++++ (100 %)
15	++	++
16	+	++
19	+	++
18	+	+++
21	++	++
22	+	+++
24	+	++
30	+	++

Таблиця 5

SEQ ID NO:	Лунки	Донори
31	+	+++
32	+	+++
33	+	+++
35	+	++
37	+	++++ (100 %)
38	+	++
39	+	++
40	+	++
42	++	++++ (100 %)
43	+	+++
44	+	++
45	+	+
46	+	+++
47	+	++
48	+	+
52	+	+
53	++	++
54	+	++
55	+	++
56	++	++++ (100 %)
62	++	++++
57	+	++
59	+	+++
60	+++	++++ (100 %)
61	+	+++
63	+	++
64	+	+++
65	++	+++
66	+	+++
67	+	++
68	+	+
69	++	+++
70	+	+++
71	+	+++
72	+	+++
73	+	++
74	+	+++
75	+	++
78	++	++
79	+	++++
80	+	++
81	+	++
85	++	++++
86	+	++
87	+	+++
88	+	++
92	+	++

## ПРИКЛАД 5

## Синтез пептидів

- Усі пептиди були синтезовані стандартним і широко використовуваним методом твердофазного синтезу пептидів за стратегією Fmoc. Після очистки методом препаративної ЗФ-ВЕРХ процедура обміну іонів здійснювали для введення фізіологічно сумісних протиіонів (наприклад, трифторацетату, ацетату, амонію або хлориду).

Ідентичність і чистота кожного окремого пептиду визначали методами мас-спектрометрії і аналітичної ЗФ-ВЕРХ. Після процедури обміну іонів пептиди одержували у вигляді білих або брудно-білих ліофілізатів чистотою від 90 % до 99,7 %.

Усі TUMAP переважно вводять у вигляді трифторацетатних солей або ацетатних солей, використання інших солей також можливе. Для вимірів у Прикладі 4 використовували трифторацетатні солі пептидів.

#### ПРИКЛАД 6

##### УФ-індукований обмін лігандами

Пептиди-кандидати для включення до складу вакцин за цим винаходом були додатково перевірені на імуногенність примуванням *in vitro*. Окремі комплекси пептид-МНС, необхідні для цих досліджень, були отримані УФ-індукованим обміном лігандів, за якого УФ-чутливі пептиди розщеплюються під дією УФ-випромінювання, і аналізується продукт обміну з пептидом, що вивчається. Тільки пептиди-кандидати, які здатні ефективно зв'язуватися з пептид-сприйнятливими молекулами МНС і стабілізувати їх, попереджають дисоціацію комплексів із МНС. Для визначення виходу реакції обміну проводили аналіз методом ELISA на основі виявлення легких ланцюгів ( $\beta 2m$ ) стабілізованих комплексів із МНС. Аналіз проводили згідно з загальним описом у роботі Rodenko і співавт. (Rodenko B, Toebe M, Hadrup SR, van Esch WJ, Molenaar AM, Schumacher TN, Ova H. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. Nat Protoc. 2006;1(3):1120-32.).

96-луночні планшети MAXISorp (NUNC) були покриті протягом ночі розчином 2 мкг/мл стрептавідину у PBS при кімнатній температурі, 4 рази промиті і блоковані протягом 30 хвилин при 37 °C у 2 % розчині BCA, що містить блокувальний буфер. Ренатуровані мономери HLA-A\*0201/MLA-001 використовувались як стандарти, охоплюючи діапазон 8-500 нг/мл. Мономерні комплекси пептид-МНС, продукти реакції обміну, що протікає під дією УФ-випромінювання, розводили у 100 разів у блокуючому буфері. Зразки інкубували протягом 1 год. за температури 37 °C, промивали чотири рази, інкубували з 2 мкг/мл кон'югованих із пероксидазою хрину антитіл проти  $\beta 2m$  протягом 1 год. за температури 37 °C, знову промивали і визначали з розчином ТМБ, реакцію зупиняли за допомогою  $\text{NH}_2\text{SO}_4$ . Поглинання вимірювали при 450 нм

Таблица 6

#### УФ-індукований обмін лігандами

SEQ ID NO.	Назва пептиду	Середній вихід реакції обміну в %	Вихід реакції обміну
81	ANKS1A-001	78	++++
87	AURKB-001	54	+++
85	BUB1B-001	59	+++
48	SNRNP20-001	54	+++
80	CEP192-001	56	+++
90	COG4-001	57	+++
89	IFT81-001	57	+++
83	MDN1-001	67	+++
82	CEP250-002	70	+++
91	NCBP1-001	65	+++
92	NEFH-001	50	++
84	OLFM1-001	48	++
86	PI4KA-001	51	+++
11	SLC3A2-001	56	+++
78	SLI-001	47	++
79	TLX3-001	70	+++
2	MMP12-003	57	+++
68	FAP-003	31	++
66	IGF2BP3-001	46	++
4	DST-001	50	++
5	MXRA5-001	57	+++
31	GFPT2-001	43	++
1	ABCA13-001	93	++++
6	DST-002	59	+++
40	MXRA5-002	56	+++

## УФ-індукований обмін лігандами

SEQ ID NO.	Назва пептиду	Середній вихід реакції обміну в %	Вихід реакції обміну
49	SAMSN1-001	47	++
8	HNRNPH-001	26	++
69	WNT5A-001	37	++
15	IL8-001	41	++
50	STAT2-001	69	+++
72	ADAM8-001	67	+++
73	COL6A3-002	81	++++
18	VCAN-001	41	++
12	SMYD3-001	50	++
3	ABCA13-002	36	++
35	BNC1-001	43	++
7	CDK4-001	45	++
19	DROSHA-001	68	+++
33	GALNT2-001	73	++++
13	AKR-001	13	+
39	LAMC2-001	61	+++
56	RAD54B-001	48	++
24	COL12A1-002	55	+++
43	CSE1-001	55	+++
45	SEC61G-001	18	+
47	PCNXL3-001	87	++++
9	TANC2-001	71	++++
70	TPX2-001	56	+++
17	HUWE1-001	45	++
54	TACC3-001	54	+++
32	CERC-001	62	+++
26	SERPINB3-001	47	++
58	CCNA2-001	54	+++
44	DPYSL4-001	77	++++
27	KIF26B-001	68	+++
51	CNOT1-001	57	+++
11	SLC34A2-001	51	+++
30	RGS4-001	49	++
20	VCAN-002	49	++
67	CDC6-001	48	++
74	THY1-001	65	+++
10	RNF213-001	84	++++
61	RCN1-001	75	++++
37	FZD-001	52	+++
71	HMMR-001	49	++
60	C11orf24-001	47	++
53	JUNB-001	51	+++
25	ELANE-001	62	+++
61	RCC1-001	77	++++
62	MAGEF1-001	83	++++
22	ACACA-001	61	+++
21	PLEKHA8-001	47	++
57	EEF2-002	31	++
41	HSP-002	47	++
38	ATP-001	19	+
46	ORMDL1-002	61	+++
59	NET1-001	82	++++
63	NCAPD2-001	76	++++

## УФ-індукований обмін лігандами

SEQ ID NO.	Назва пептиду	Середній вихід реакції обміну в %	Вихід реакції обміну
42	VPS13B-001	63	+++
64	C12orf44-001	34	++
23	ITGA11-001	53	+++
75	DIO2-001	50	++
28	ANKH-001	52	+++
65	HERC4-001	61	+++
16	P2RY6-001	91	++++

Пептиди-кандидати, що демонстрували високий вихід реакції обміну (тобто вище 40 %, переважно вище 50 %, більш переважно вище 70 % і найбільш переважно вище 80 %) є зазвичай переважними для синтезу і продукції антитіл або їх фрагментів і (або) рецепторів Т-клітин або їх фрагментів, оскільки вони показують достатню авідність до молекул МНС і попереджають дисоціацію комплексів МНС.

## ПРИКЛАД 7

Зв'язування та імуногенність вибраних пептидів, що зв'язані з молекулами МНС II класу

Білки HLA II класу поділяються на 3 головних ізоформи: HLA-DR, -DP, DQ, що кодуються багатьма гаплотипами. Комбінація різних  $\alpha$ - і  $\beta$ -ланцюгів підвищує різноманітність білків HLA II класу, виявлених у довільно вибраній популяції. Отже, вибрані TUMAP, що утворюють комплекси з молекулами HLA II класу, мають зв'язатися з декількома різними молекулами HLA-DR (тобто, продемонструвати здатність до проміскуїтетного зв'язування), щоби бути здатними сприяти ефективній відповіді Т-клітин у значущої відсоткової долі пацієнтів.

Проміскуїтетне зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з HLA-DR різних гаплотипів і стабільність утворених комплексів оцінювали визначенням *in vitro* зв'язування, проведеним зовнішнім постачальником послуг як викладено нижче.

Матеріали і методи

Перелік пептидів

Ідентифікатор послідовності	Ід. № пептиду	Послідовність	Походження	Розмір
76	MMP12-002	INNYTPDMNREDVDYAIR	IMA-942	18
77	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	IMA-942	17

Перелік досліджених гаплотипів HLA-DR

7 проаналізованих гаплотипів HLA-DR були вибрані завдяки їх частотам виявлення серед HLA-A\*02- і HLA-A\*24-позитивного населення Північної Америки (Таблиці 7.1 і 7.2).

Дані були отримані з аналізу 1,35 мільйонів типованих за HLA добровольців, зареєстрованих у Національній програмі донорів кісного мозку (Mori et al., 1997). Проаналізоване населення було поділене на такі етнічні групи: американці європеїдної раси (N=997193), афроамериканці (N=110057), американці монголоїдної раси (N=81139), латиноамериканці (N=100128) і корінні американці (N=19203).



Таблиця 7.1

Частота виявлення гаплотипів серед HLA-A\*02-позитивних жителів Північної Америки:  
Проаналізовані гаплотипи виділені сірим кольором

Серологічний гаплотип		Частота виявлення гаплотипу [% HLA-A*02-позитивних осіб]				
HLA-A	HLA-DR	Європеїдні раси	Афроамериканці	Монголоїдні раси	Латиноамериканці	Корінні американці
2	1	8,8	7,8	3,0	6,1	6,8
2	2	14,9	13,8	17,6	9,7	13,8
2	3	6,1	11,1	1,8	5,3	5,5
2	4	21,3	9,4	15,7	23,6	24,9
2	5	1,2	2,3	1,0	1,3	1,8
2	6	15,2	20,0	11,5	17,7	15,9
2	7	13,0	10,5	2,5	7,8	9,0
2	8	4,2	5,7	10,2	16,2	8,7
2	9	1,2	2,8	16,0	1,0	2,9
2	10	1,4	2,4	1,2	1,3	0,8
2	11	8,7	10,6	5,2	6,4	4,8
2	12	2,6	2,8	12,3	1,8	1,9
2	90	1,4	0,8	2,0	1,7	3,3
ЗАГАЛОМ		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Таблиця 7.2

Частота виявлення гаплотипів серед HLA-A\*24-позитивних жителів Північної Америки:  
Проаналізовані гаплотипи виділені сірим кольором

Серологічний гаплотип		Частота виявлення гаплотипу [% HLA-A*24-позитивних осіб]				
HLA-A	HLA-DR	Європеїдні раси	Афроамериканці	Монголоїдні раси	Латиноамериканці	Корінні американці
24	1	8,2	7,9	5,4	4,1	4,6
24	2	15,7	18,8	24,6	10,7	14,8
24	3	6,0	7,5	1,4	3,7	4,0
24	4	14,9	14,4	19,8	25,8	21,6
24	5	2,0	1,6	1,4	2,7	1,0
24	6	17,0	18,7	9,6	20,5	20,7
24	7	9,2	7,9	2,5	4,8	4,3
24	8	4,0	3,8	5,7	12,4	11,3
24	9	1,4	1,7	9,9	0,7	5,8
24	10	1,6	1,2	0,8	2,0	0,6
24	11	16,5	8,0	5,2	9,0	5,4
24	12	1,8	7,5	11,5	2,2	2,4
24	90	1,6	1,0	2,2	1,3	3,3
ЗАГАЛОМ		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

#### Принцип методу

- 5 Аналіз зв'язування пептидів з молекулами МНС за методикою REVEAL® компанії ProImmune виявляє здатність кожного пептиду-кандидата зв'язуватись із молекулою HLA II класу вибраного гаплотипу і стабілізувати комплекс HLA-пептид. У такий спосіб пептиди-кандидати з'єднуються in vitro з конкретним білком HLA II класу. Рівень злиття пептиду з молекулами HLA вимірюють оцінкою присутності чи відсутності нативної конформації зібраного комплексу HLA-пептид у момент часу 0 після завершення процедури рефолдингу (так звана швидкість асоціації "on-rate").

10 Зв'язувальна здатність пептиду-кандидата з конкретною молекулою HLA порівнюють зі зв'язувальною здатністю пептиду, щодо якого відомо, що він дуже сильно зв'язується

(позитивний контроль), що дає в результаті відповідний показник зв'язування МНС-пептид за методикою REVEAL®. Пептид позитивного контролю можна вибрати і придбати у компанії ProImmune, виходячи з її досвіду, окремо для кожного гаплотипу HLA.

Окрім афінності пептиду до конкретної молекули HLA, для наявності імунної відповіді визначальну роль відіграє довгострокова стабільність утвореного комплекс HLA-пептид. Відповідно, присутність утвореного комплексу HLA-пептид вимірюють після його інкубації протягом 24 год. за температури 37 °C. В результаті, стабільність утвореного комплексу HLA-пептид розраховують як співвідношення показників зв'язування після 24 год. і показників зв'язування, отриманих безпосередньо після рефолдингу (відповідно, у момент часу 0),

виражених у відсотках.

Результати

Аналіз POSTN-002 і MMP12-002 за методикою REVEAL® аналізу зв'язування МНС-пептид виявив зв'язування обох пептидів із HLA різних гаплотипів. Було показано, що POSTN-002 утворює комплекс із HLA у п'ятьох, а MMP12-002 - у чотирьох з 7 досліджених гаплотипів (Фігура 5). Обидва пептиди не зв'язуються з молекулами HLA, що кодуються HLA-DR3 і HLA-DR6. Визначені показники зв'язування знаходилися в діапазоні від 0,02 до 2,5 % у порівнянні з позитивним контролем і безумовно були вище показників для пептидів, що не зв'язуються.

Аналіз стабільності утворених комплексів HLA-POSTN-002 і HLA-MMP12-002 виявив, що 3 і 2 з 6 досліджених комплексів HLA-пептид демонстрували стабільність після 24 год. за температури 37 °C, відповідно (Фігура 6).

Висновок щодо імуногенності пептидів на основі їхньої здатності зв'язуватися з молекулою HLA можна зробити порівнянням показнику зв'язування цього пептиду з показником зв'язування для пептиду з відомою імуногенністю. Отже, для цього порівняння були вибрані п'ять добре вивчених пептидів з визначеною імуногенністю. Імуногенність цих пептидів була визначена *ex vivo* у зразках крові вакцинованих пацієнтів методом внутрішньоклітинного забарвлення (ICS) цитокінів Т-клітин CD4.

В принципі, методом ICS аналізують якість конкретних Т-клітин що стосується їхньої ефektorної функції. З цією метою моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) культивували *in vitro* і потім рестимулювали досліджуванним пептидом, контрольним пептидом і негативним контролем (у цьому документі - IMITATOR). Після цього рестимульовані клітини забарвлювали для виявлення продукції IFN-гама, TNF-альфа, IL-2 та IL-10, а також експресії коstimуляторної молекули CD154. Підрахунок клітин, що відреагували на цей вплив, здійснювали на проточному цитометрі (Фігура 7).

Аналіз імуногенності виявив 100 %-ну імунну відповідь після вакцинації пептидами IMA950 (BIR-002 і MET-005) у 16 пацієнтів і імунну відповідь від 44 % до 86 % після вакцинації пептидами IMA910 (CEA-006, TGFBI-004 і MMP-001) у 71 пацієнта.

Для порівняння показників зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з показниками зв'язування пептидів IMA910 і IMA950 дані для всіх пептидів були зведені у таблицю для кожного досліджуваного гаплотипу HLA-DR відповідно до визначеного показника зв'язування (Таблиці 8.1-8.5).

Таблиця 8.1

Показники зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з HLA-DR1 у порівнянні з показниками зв'язування пептидів з відомою імуногенністю з молекулами МНС II класу:  
POSTN-002 і MMP12-002 виділені сірим кольором

Ранг пептиду	Код пептиду	Походження	Відносний показник зв'язування HLA-DR1
1	BIR-002	IMA950	40,06
2	CEA-006	IMA910	1,31
3	MET-005	IMA950	0,87
4	POSTN-002	IMA-942	0,24
5	MMP-001	IMA901	0,19
6	MMP12-002	IMA-942	0,04
7	TGFBI-004	IMA910	0,03

Таблиця 8.2

Показники зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з HLA-DR2 у порівнянні з показниками зв'язування пептидів з відомою імуногенністю з молекулами МНС II класу:  
POSTN-002 і MMP12-002 виділені сірим кольором

Ранг пептиду	Код пептиду	Походження	Відносний показник зв'язування HLA-DR2
1	MMP12-002	IMA-942	2,43
2	MMP-001	IMA901	0,7
3	POSTN-002	IMA-942	0,68
4	MET-005	IMA950	0,28
5	TGFBI-004	IMA910	0,28
6	BIR-002	IMA950	0,05
7	CEA-006	IMA910	0,03

Таблиця 8.3

Показники зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з HLA-DR4 у порівнянні з показниками зв'язування пептидів з відомою імуногенністю з молекулами МНС II класу:  
POSTN-002 і MMP12-002 виділені сірим кольором

Ранг пептиду	Код пептиду	Походження	Відносний показник зв'язування HLA-DR4
1	CEA-006	IMA910	39,65
2	BIR-002	IMA950	6,12
3	MET-005	IMA950	5,89
4	MMP12-002	IMA-942	0,74
5	MMP-001	IMA901	0,06
6	POSTN-002	IMA-942	0,02
7	TGFBI-004	IMA910	0,02

Таблиця 8.4

Показники зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з HLA-DR5 у порівнянні з показниками зв'язування пептидів з відомою імуногенністю з молекулами МНС II класу:  
POSTN-002 і MMP12-002 виділені сірим кольором

Ранг пептиду	Код пептиду	Походження	Відносний показник зв'язування HLA-DR5
1	BIR-002	IMA950	103,9
2	MMP-001	IMA901	47,82
3	CEA-006	IMA910	24,27
4	MET-005	IMA950	0,12
5	POSTN-002	IMA-942	0,08
6	MMP12-002	IMA-942	0,04
7	TGFBI-004	IMA910	0,04

Таблиця 8.5

Показники зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з HLA-DR7 у порівнянні з показниками зв'язування пептидів з відомою імуногенністю з молекулами МНС II класу: POSTN-002 і MMP12-002 виділені сірим кольором

Ранг пептиду	Код пептиду	Походження	Відносний показник зв'язування HLA-DR7
1	MET-005	IMA950	3,69
2	CEA-006	IMA910	0,63
3	POSTN-002	IMA-942	0,47
4	BIR-002	IMA950	0,27
5	TGFBI-004	IMA910	0,01
6	MMP-001	IMA901	0
7	MMP12-002	IMA-942	0

Порівняння показників зв'язування POSTN-002 і MMP12-002 з показниками зв'язування інших пептидів з відомою імуногенністю з молекулами МНС II класу показали, що зв'язувальна здатність обох пептидів розташовується головним чином посередині і аж до нижньої половини таблиць, за винятком HLA-DR2. Зв'язувальна здатність обох пептидів щодо HLA-DR2 розташована у верхній половині таблиці, причому MMP12-002 є найвищим кандидатом. На основі цього аналізу треба очікувати, що обидва пептиди, POSTN-002 і MMP12-002, також індують імунну відповідь.

#### Перелік посилань

Acuff HB, Sinnamon M, Fingleton B, Boone B, Levy SE, Chen X, Pozzi A, Carbone DP, Schwartz DR, Moin K, Sloane BF, Matrisian LM (2006). Analysis of host-and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66, 7968-7975.

Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123, 409-421.

Albig AR, Schiemann WP (2005). Identification and characterization of regulator of G protein signaling 4 (RGS4) as a novel inhibitor of tubulogenesis: RGS4 inhibits mitogen-activated protein kinases and vascular endothelial growth factor signaling. *Mol. Biol. Cell* 16, 609-625.

Allison JP, Krummel MF (1995). The Yin and Yang of T cell costimulation. *Science* 270, 932-933.

An CH, Kim YR, Kim HS, Kim SS, Yoo NJ, Lee SH (2012). Frameshift mutations of vacuolar protein sorting genes in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *Hum. Pathol.* 43, 40-47.

Appay V, Speiser DE, Rufer N, Reynard S, Barbey C, Cerottini JC, Leyvraz S, Pinilla C, Romero P (2006). Decreased specific CD8+T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. *Eur. J Immunol.* 36, 1805-1814.

Araki W, Takahashi-Sasaki N, Chui DH, Saito S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Murayama KS, Kametani F, Shiraishi H, Komano H, Tabira T (2008). A family of membrane proteins associated with presenilin expression and gamma-secretase function. *FASEB J* 22, 819-827.

Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Hesselgesser J, Horuk R, Strieter RM (1997). The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Leukoc. Biol.* 62, 554-562.

Asteriti IA, Rensen WM, Lindon C, Lavia P, Guarguaglini G (2010). The Aurora-A/TPX2 complex: a novel oncogenic holoenzyme? *Biochim. Biophys. Acta* 1806, 230-239.

Aylsworth A, Jiang SX, Desbois A, Hou ST (2009). Characterization of the role of full-length CRMP3 and its calpain-cleaved product in inhibiting microtubule polymerization and neurite outgrowth. *Exp. Cell Res.* 315, 2856-2868.

Badigian FL, Oshima CT, De Oliveira LF, De Oliveira CH, De Sousa DR, Gomes TS, Goncalves WJ (2009). Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. *Oncol Rep.* 21, 313-320.

Bargo S, Raafat A, McCurdy D, Amirjazi I, Shu Y, Traicoff J, Plant J, Vonderhaar BK, Callahan R (2010). Transforming acidic coiled-coil protein-3 (Tacc3) acts as a negative regulator of Notch signaling through binding to CDC10/Ankyrin repeats. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 400, 606-612.

Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K, Verhoeven G, Swinnen JV (2007). Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res.* 67, 8180-8187.

5 Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854.

Behrens P, Brinkmann U, Fogt F, Wernert N, Wellmann A (2001). Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. *Anticancer Res.* 21, 2413-2417.

10 Belaaouaj A, Kim KS, Shapiro SD (2000). Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289, 1185-1188.

Beljan PR, Durdov MG, Capkun V, Ivcevic V, Pavlovic A, Soljic V, Peric M (2012). IMP3 can predict aggressive behaviour of lung adenocarcinoma. *Diagn. Pathol.* 7, 165.

15 Benaglio P, McGee TL, Capelli LP, Harper S, Berson EL, Rivolta C (2011). Next generation sequencing of pooled samples reveals new SNRNP200 mutations associated with retinitis pigmentosa. *Hum. Mutat.* 32, E2246-E2258.

Bennett G, Sadlier D, Doran PP, Macmathuna P, Murray DW (2011). A functional and transcriptomic analysis of NET1 bioactivity in gastric cancer. *BMC. Cancer* 11, 50.

Bergner A, Kellner J, Tufman A, Huber RM (2009). Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. *J Exp. Clin Cancer Res.* 28, 25.

20 Bird AW, Hyman AA (2008). Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *J Cell Biol.* 182, 289-300.

Boni R, Wellmann A, Man YG, Hofbauer G, Brinkmann U (1999). Expression of the proliferation and apoptosis-associated CAS protein in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. *Am. J Dermatopathol.* 21, 125-128.

25 Brandt S, Ellwanger K, Beuter-Gunia C, Schuster M, Hausser A, Schmitz I, Beer-Hammer S (2010). SLy2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 42, 1472-1481.

Brozic P, Turk S, Rizner TL, Gobec S (2011). Inhibitors of aldo-keto reductases AKR1C1-AKR1C4. *Curr. Med. Chem.* 18, 2554-2565.

30 Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F (2004). From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 29-43.

Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Moller M, Eriksen JA, Gaudernack G (2006). Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 1553-1564.

35 Brusselmans K, De SE, Verhoeven G, Swinnen JV (2005). RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase- $\alpha$  gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 65, 6719-6725.

Brustmann H (2004). Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Gynecol. Oncol* 92, 268-276.

Bukau B, Horwich AL (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.

40 Byrns MC, Jin Y, Penning TM (2011). Inhibitors of type 5  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): overview and structural insights. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 125, 95-104.

Calabrese F, Lunardi F, Balestro E, Marulli G, Perissinotto E, Loy M, Nannini N, Valente M, Saetta M, Agostini C, Rea F (2012). Serpin B4 isoform overexpression is associated with aberrant epithelial proliferation and lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pathology* 44, 192-198.

45 Cao X, Coskun U, Rossle M, Buschhorn SB, Grzybek M, Dafforn TR, Lenoir M, Overduin M, Simons K (2009). Golgi protein FAPP2 tubulates membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 21121-21125.

50 Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, Louis R, Noel A, Foidart JM (2003). Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 49, 875-884.

Chajes V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V (2006). Acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res.* 66, 5287-5294.

55 Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell Biochem.* 253, 269-285.

Chami M, Gozuacik D, Saigo K, Capiod T, Falson P, Lecoecur H, Urashima T, Beckmann J, Gougeon ML, Claret M, le MM, Brechot C, Paterlini-Brechot P (2000). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis. *Oncogene* 19, 2877-2886.

Chandler S, Cossins J, Lury J, Wells G (1996). Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 228, 421-429.

5 Chang CC, Tai CJ, Su TC, Shen KH, Lin SH, Yeh CM, Yeh KT, Lin YM, Jiang MC (2012). The prognostic significance of nuclear CSE1L in urinary bladder urothelial carcinomas. *Ann. Diagn. Pathol.* 16, 362-368.

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

10 Chen CY, Fang HY, Chiou SH, Yi SE, Huang CY, Chiang SF, Chang HW, Lin TY, Chiang IP, Chow KC (2011a). Sumoylation of eukaryotic elongation factor 2 is vital for protein stability and anti-apoptotic activity in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Sci.* 102, 1582-1589.

Chen CY, Fang HY, Chiou SH, Yi SE, Huang CY, Chiang SF, Chang HW, Lin TY, Chiang IP, Chow KC (2011b). Sumoylation of eukaryotic elongation factor 2 is vital for protein stability and anti-apoptotic activity in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Sci.* 102, 1582-1589.

15 Chen D, Brooks CL, Gu W (2006). ARF-BP1 as a potential therapeutic target. *Br. J Cancer* 94, 1555-1558.

Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W (2005a). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071-1083.

20 Chen DR, Chien SY, Kuo SJ, Teng YH, Tsai HT, Kuo JH, Chung JG (2010a). SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. *Anticancer Res.* 30, 4135-4140.

Chen J, Emara N, Solomides C, Parekh H, Simpkins H (2010b). Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 1103-1111.

25 Chen JF, Zhang LJ, Zhao AL, Wang Y, Wu N, Xiong HC, Liang Z, Li JY, Huang XF, Yang Y (2005b). [Abnormal expression of Thy-1 as a novel tumor marker in lung cancer and its prognostic significance]. *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.* 85, 1921-1925.

Chen P, Wang SJ, Wang HB, Ren P, Wang XQ, Liu WG, Gu WL, Li DQ, Zhang TG, Zhou CJ (2012). The distribution of IGF2 and IMP3 in osteosarcoma and its relationship with angiogenesis. *J Mol. Histol.* 43, 63-70.

30 Cho NH, Hong KP, Hong SH, Kang S, Chung KY, Cho SH (2004). MMP expression profiling in recurrent stage IB lung cancer. *Oncogene* 23, 845-851.

Choi KU, Yun JS, Lee IH, Heo SC, Shin SH, Jeon ES, Choi YJ, Suh DS, Yoon MS, Kim JH (2010). Lysophosphatidic acid-induced expression of periostin in stromal cells: Prognostic relevance of periostin expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.*

35 Chong IW, Chang MY, Chang HC, Yu YP, Sheu CC, Tsai JR, Hung JY, Chou SH, Tsai MS, Hwang JJ, Lin SR (2006). Great potential of a panel of multiple hMTH1, SPD, ITGA11 and COL11A1 markers for diagnosis of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 16, 981-988.

Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S (1997). Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* 80, 1489-1496.

40 Chung FY, Cheng TL, Chang HJ, Chiu HH, Huang MY, Chang MS, Chen CC, Yang MJ, Wang JY, Lin SR (2010). Differential gene expression profile of MAGE family in taiwanese patients with colorectal cancer. *J Surg. Oncol* 102, 148-153.

Ciocca DR, Calderwood SK (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress. Chaperones.* 10, 86-103.

45 Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL (1992). Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* 52, 3648-3654.

Claudio JO, Zhu YX, Benn SJ, Shukla AH, McGlade CJ, Falcioni N, Stewart AK (2001). HACs1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. *Oncogene* 20, 5373-5377.

50 Coe BP, Henderson LJ, Garnis C, Tsao MS, Gazdar AF, Minna J, Lam S, MacAulay C, Lam WL (2005). High-resolution chromosome arm 5p array CGH analysis of small cell lung carcinoma cell lines. *Genes Chromosomes. Cancer* 42, 308-313.

Colombetti S, Basso V, Mueller DL, Mondino A (2006). Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J Immunol.* 176, 2730-2738.

Confalonieri S, Quarto M, Goisis G, Nuciforo P, Donzelli M, Jodice G, Pelosi G, Viale G, Pece S, Di Fiore PP (2009). Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor. *Oncogene* 28, 2959-2968.

60 Cooper CR, Graves B, Pruitt F, Chaib H, Lynch JE, Cox AK, Sequeria L, van Golen KL, Evans A, Czymmek K, Bullard RS, Donald CD, Sol-Church K, Gendernalik JD, Weksler B, Farach-Carson MC,

Macoska JA, Sikes RA, Pienta KJ (2008). Novel surface expression of reticulocalbin 1 on bone endothelial cells and human prostate cancer cells is regulated by TNF-alpha. *J Cell Biochem.* 104, 2298-2309.

5 Cooper WA, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, Kennedy C, Sutherland RL, Lee CS (2009). Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. *Histopathology* 55, 28-36.

Cordes C, Munzel AK, Gorogh T, Leuschner I, Ambrosch P, Gottschlich S, Hoffmann M (2010). Prognostic relevance of the proliferation marker REPP86 for laryngeal cancer. *Anticancer Res* 30, 3541-3547.

10 Creighton CJ, Bromberg-White JL, Misek DE, Monsma DJ, Brichory F, Kuick R, Giordano TJ, Gao W, Omenn GS, Webb CP, Hanash SM (2005). Analysis of tumor-host interactions by gene expression profiling of lung adenocarcinoma xenografts identifies genes involved in tumor formation. *Mol. Cancer Res* 3, 119-129.

15 D'Angelo G, Rega LR, De Matteis MA (2012). Connecting vesicular transport with lipid synthesis: FAPP2. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 1089-1095.

Da Forno PD, Pringle JH, Hutchinson P, Osborn J, Huang Q, Potter L, Hancox RA, Fletcher A, Saldanha GS (2008). WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. *Clin Cancer Res* 14, 5825-5832.

20 de Souza Meyer EL, Dora JM, Wagner MS, Maia AL (2005). Decreased type 1 iodothyronine deiodinase expression might be an early and discrete event in thyroid cell dedifferentiation towards papillary carcinoma. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 62, 672-678.

Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A (1997). Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern. Med* 242, 41-48.

25 Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic S (2006). Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res.* 12, 4163-4170.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.

30 Denys H, De WO, Nusgens B, Kong Y, Sciot R, Le AT, Van DK, Jadidizadeh A, Tejpar S, Mareel M, Alman B, Cassiman JJ (2004). Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours. *Br. J Cancer* 90, 1443-1449.

Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909-2915.

35 Dharmavaram RM, Huynh AI, Jimenez SA (1998). Characterization of human chondrocyte and fibroblast type XII collagen cDNAs. *Matrix Biol.* 16, 343-348.

Dobashi Y, Shoji M, Jiang SX, Kobayashi M, Kawakubo Y, Kameya T (1998). Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol.* 153, 963-972.

40 Dolznig H, Schweifer N, Puri C, Kraut N, Rettig WJ, Kerjaschki D, Garin-Chesa P (2005). Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun.* 5, 10.

Dong-Dong L (2007). Small interfering RNA (siRNA) inhibited human liver cancer cell line SMMC7721 proliferation and tumorigenesis. *Hepatogastroenterology* 54, 1731-1735.

45 Drucker KL, Kitange GJ, Kollmeyer TM, Law ME, Passe S, Ryneerson AL, Blair H, Soderberg CL, Morlan BW, Ballman KV, Giannini C, Jenkins RB (2009). Characterization and gene expression profiling in glioma cell lines with deletion of chromosome 19 before and after microcell-mediated restoration of normal human chromosome 19. *Genes Chromosomes. Cancer* 48, 854-864.

50 Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 2346-2357.

Ecimovic P, Murray D, Doran P, McDonald J, Lambert DG, Buggy DJ (2011). Direct effect of morphine on breast cancer cell function in vitro: role of the NET1 gene. *Br. J Anaesth.* 107, 916-923.

- Ehrmann J, Strakova N, Vrzalikova K, Hezova R, Kolar Z (2008). Expression of STATs and their inhibitors SOCS and PIAS in brain tumors. In vitro and in vivo study. *Neoplasma* 55, 482-487.
- Fang WY, Liu TF, Xie WB, Yang XY, Wang S, Ren CP, Deng X, Liu QZ, Huang ZX, Li X, Ding YQ, Yao KT (2005). Reexploring the possible roles of some genes associated with nasopharyngeal carcinoma using microarray-based detection. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 37, 541-546.
- 5 Feng CJ, Li HJ, Li JN, Lu YJ, Liao GQ (2008). Expression of *Mcm7* and *Cdc6* in oral squamous cell carcinoma and precancerous lesions. *Anticancer Res* 28, 3763-3769.
- Findeis-Hosey JJ, Xu H (2012). Insulin-like growth factor II-messenger RNA-binding protein-3 and lung cancer. *Biotech. Histochem.* 87, 24-29.
- 10 Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO, Wang HL, Xu H (2010). IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* 41, 477-484.
- Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8809-8814.
- 15 Fukuda T, Oyamada H, Isshiki T, Maeda M, Kusakabe T, Hozumi A, Yamaguchi T, Igarashi T, Hasegawa H, Seidoh T, Suzuki T (2007). Distribution and variable expression of secretory pathway protein reticulocalbin in normal human organs and non-neoplastic pathological conditions. *J Histochem. Cytochem.* 55, 335-345.
- Gamero AM, Young MR, Mentor-Marcel R, Bobe G, Scarzello AJ, Wise J, Colburn NH (2010). STAT2 contributes to promotion of colorectal and skin carcinogenesis. *Cancer Prev. Res. (Phila)* 3, 495-504.
- 20 Gares SL, Pilarski LM (2000). Balancing thymocyte adhesion and motility: a functional linkage between beta1 integrins and the motility receptor RHAMM. *Dev. Immunol* 7, 209-225.
- Garg M, Kanojia D, Saini S, Suri S, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010a). Germ cell-specific heat shock protein 70-2 is expressed in cervical carcinoma and is involved in the growth, migration, and invasion of cervical cells. *Cancer* 116, 3785-3796.
- 25 Garg M, Kanojia D, Seth A, Kumar R, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010b). Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion. *Eur. J Cancer* 46, 207-215.
- 30 Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 383-393.
- Ghosh S, Albitar L, LeBaron R, Welch WR, Samimi G, Birrer MJ, Berkowitz RS, Mok SC (2010). Up-regulation of stromal versican expression in advanced stage serous ovarian cancer. *Gynecol. Oncol* 119, 114-120.
- 35 Gorrin Rivas MJ, Arie S, Furutani M, Harada T, Mizumoto M, Nishiyama H, Fujita J, Imamura M (1998). Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: correlation with angiostatin generation and its clinical significance. *Hepatology* 28, 986-993.
- Gorrin-Rivas MJ, Arie S, Mori A, Takeda Y, Mizumoto M, Furutani M, Imamura M (2000). Implications of human macrophage metalloelastase and vascular endothelial growth factor gene expression in angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 231, 67-73.
- 40 Graf F, Mosch B, Koehler L, Bergmann R, Wuest F, Pietzsch J (2010). Cyclin-dependent kinase 4/6 (*cdk4/6*) inhibitors: perspectives in cancer therapy and imaging. *Mini. Rev. Med. Chem.* 10, 527-539.
- Greenfield JJ, High S (1999). The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci.* 112 (Pt 10), 1477-1486.
- 45 Gregory KE, Keene DR, Tufa SF, Lunstrum GP, Morris NP (2001). Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. *J Bone Miner. Res.* 16, 2005-2016.
- Grunda JM, Fiveash J, Palmer CA, Cantor A, Fathallah-Shaykh HM, Nabors LB, Johnson MR (2010). Rationally designed pharmacogenomic treatment using concurrent capecitabine and radiotherapy for glioblastoma; gene expression profiles associated with outcome. *Clin Cancer Res.* 16, 2890-2898.
- 50 Gruter P, Tabernero C, von KC, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber BK, Izaurralde E (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol. Cell* 1, 649-659.
- 55 Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Blondal T, Gylfason A, Agnarsson BA, Benediktsdottir KR, Magnusdottir DN, Orlygsdottir G, Jakobsdottir M, Stacey SN, Sigurdsson A, Wahlfors T, Tammela T, Breyer JP, McReynolds KM, Bradley KM, Saez B, Godino J, Navarrete S, Fuertes F, Murillo L, Polo E, Aben KK, van Oort IM, Suarez BK, Helfand BT, Kan D, Zanon C, Frigge ML, Kristjansson K, Gulcher JR, Einarsson GV, Jonsson E, Catalona WJ, Mayordomo JI, Kienmeney
- 60



LA, Smith JR, Schleutker J, Barkardottir RB, Kong A, Thorsteinsdottir U, Rafnar T, Stefansson K (2009). Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet.* 41, 1122-1126.

5 Guo Y, Hsu DK, Feng SL, Richards CM, Winkles JA (2001). Polypeptide growth factors and phorbol ester induce progressive ankylosis (ank) gene expression in murine and human fibroblasts. *J Cell Biochem.* 84, 27-38.

Hagemann T, Gunawan B, Schulz M, Fuzesi L, Binder C (2001). mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. *Eur. J Cancer* 37, 1839-1846.

10 Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y (2006). Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 97, 113-118.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.

15 Han S, Nam J, Li Y, Kim S, Cho SH, Cho YS, Choi SY, Choi J, Han K, Kim Y, Na M, Kim H, Bae YC, Choi SY, Kim E (2010). Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. *J Neurosci.* 30, 15102-15112.

Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.

20 Hase ME, Yalamanchili P, Visa N (2006). The Drosophila heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M protein, HRP59, regulates alternative splicing and controls the production of its own mRNA. *J Biol. Chem.* 281, 39135-39141.

25 Hernandez I, Moreno JL, Zanduetta C, Montuenga L, Lecanda F (2010). Novel alternatively spliced ADAM8 isoforms contribute to the aggressive bone metastatic phenotype of lung cancer. *Oncogene* 29, 3758-3769.

Hitakomate E, Hood FE, Sanderson HS, Clarke PR (2010). The methylated N-terminal tail of RCC1 is required for stabilisation of its interaction with chromatin by Ran in live cells. *BMC. Cell Biol.* 11, 43.

30 Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, Herrero E, Balcells S, Gonzalez-Duarte R (2002). ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0027.

Ho CY, Wong CH, Li HY (2008). Perturbation of the chromosomal binding of RCC1, Mad2 and survivin causes spindle assembly defects and mitotic catastrophe. *J Cell Biochem.* 105, 835-846.

35 Hochrainer K, Mayer H, Baranyi U, Binder B, Lipp J, Kroismayr R (2005). The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects. *Genomics* 85, 153-164.

Hofmann HS, Hansen G, Richter G, Taege C, Simm A, Silber RE, Burdach S (2005). Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 11, 1086-1092.

40 Honda A, Valogne Y, Bou NM, Brechot C, Faivre J (2012). An intron-retaining splice variant of human cyclin A2, expressed in adult differentiated tissues, induces a G1/S cell cycle arrest in vitro. *PLoS. ONE.* 7, e39249.

45 Honore B, Baandrup U, Vorum H (2004). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. *Exp. Cell Res.* 294, 199-209.

Hood FE, Royle SJ (2011). Pulling it together: The mitotic function of TACC3. *Bioarchitecture.* 1, 105-109.

Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy.* 5, 973-979.

50 Houghton AM, Grisolan JL, Baumann ML, Kobayashi DK, Hautamaki RD, Nehring LC, Cornelius LA, Shapiro SD (2006). Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases. *Cancer Res* 66, 6149-6155.

Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK, Shapiro SD (2010). Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med.* 16, 219-223.

Hovhannisyan RH, Carstens RP (2007). Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. *J Biol. Chem.* 282, 36265-36274.

Hua D, Shen L, Xu L, Jiang Z, Zhou Y, Yue A, Zou S, Cheng Z, Wu S (2012). Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 regulates cellular metastasis-associated behavior in gastric cancer. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1267-1274.

Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M (2005). Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23, 8765-8773.

Huang KH, Chiou SH, Chow KC, Lin TY, Chang HW, Chiang IP, Lee MC (2010). Overexpression of aldo-keto reductase 1C2 is associated with disease progression in patients with prostatic cancer. *Histopathology* 57, 384-394.

Huang MY, Wang HM, Tok TS, Chang HJ, Chang MS, Cheng TL, Wang JY, Lin SR (2012). EVI2B, ATP2A2, S100B, TM4SF3, and OLFM4 as potential prognostic markers for postoperative Taiwanese colorectal cancer patients. *DNA Cell Biol.* 31, 625-635.

Huo J, Liu Y, Ma J, Xiao S (2010). A novel splice-site mutation of ATP2A2 gene in a Chinese family with Darier disease. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 769-772.

Hwang YS, Park KK, Cha IH, Kim J, Chung WY (2012). Role of insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein-3 in invadopodia formation and the growth of oral squamous cell carcinoma in athymic nude mice. *Head Neck* 34, 1329-1339.

Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y (2004). ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin Cancer Res.* 10, 8363-8370.

Ishikawa Y, Vranka J, Wirz J, Nagata K, Bachinger HP (2008). The rough endoplasmic reticulum-resident FK506-binding protein FKBP65 is a molecular chaperone that interacts with collagens. *J Biol. Chem.* 283, 31584-31590.

Ito K, Takahashi A, Morita M, Suzuki T, Yamamoto T (2011). The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA deadenylation and cell viability. *Protein Cell* 2, 755-763.

Iuchi S, Green H (1999). Basonuclin, a zinc finger protein of keratinocytes and reproductive germ cells, binds to the rRNA gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 9628-9632.

Jalbout M, Bouaouina N, Gargouri J, Corbex M, Ben AS, Chouchane L (2003). Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 193, 75-81.

Jeng YM, Wang TH, Lu SH, Yuan RH, Hsu HC (2009). Prognostic significance of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression in gastric adenocarcinoma. *Br. J Surg* 96, 66-73.

Jung CK, Jung JH, Park GS, Lee A, Kang CS, Lee KY (2006). Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel independent prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Pathol. Int* 56, 503-509.

Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4611-4615.

Kabbarah O, Nogueira C, Feng B, Nazarian RM, Bosenberg M, Wu M, Scott KL, Kwong LN, Xiao Y, Cordon-Cardo C, Granter SR, Ramaswamy S, Golub T, Duncan LM, Wagner SN, Brennan C, Chin L (2010). Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. *PLoS. ONE.* 5, e10770.

Kadara H, Lacroix L, Behrens C, Solis L, Gu X, Lee JJ, Tahara E, Lotan D, Hong WK, Wistuba II, Lotan R (2009). Identification of gene signatures and molecular markers for human lung cancer prognosis using an in vitro lung carcinogenesis system. *Cancer Prev. Res (Phila)* 2, 702-711.

Kamlekar RK, Simanshu DK, Gao YG, Kenoth R, Pike HM, Prendergast FG, Malinina L, Molotkovsky JG, Venyaminov SY, Patel DJ, Brown RE (2013). The glycolipid transfer protein (GLTP) domain of phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein-2 (FAPP2): structure drives preference for simple neutral glycosphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 417-427.

Kanno A, Satoh K, Masamune A, Hirota M, Kimura K, Umino J, Hamada S, Satoh A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T (2008). Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 122, 2707-2718.

Kanno T, Kamba T, Yamasaki T, Shibasaki N, Saito R, Terada N, Toda Y, Mikami Y, Inoue T, Kanematsu A, Nishiyama H, Ogawa O, Nakamura E (2012). JunB promotes cell invasion and angiogenesis in VHL-defective renal cell carcinoma. *Oncogene* 31, 3098-3110.

Kao RH, Francia G, Poulsom R, Hanby AM, Hart IR (2003). Application of differential display, with in situ hybridization verification, to microscopic samples of breast cancer tissue. *Int. J. Exp. Pathol.* 84, 207-212.

Kars MD, Iseri OD, Gunduz U (2011). A microarray based expression profiling of paclitaxel and vincristine resistant MCF-7 cells. *Eur. J Pharmacol.* 657, 4-9.

Katagiri C, Iida T, Nakanishi J, Ozawa M, Aiba S, Hibino T (2010). Up-regulation of serpin SCCA1 is associated with epidermal barrier disruption. *J Dermatol. Sci.* 57, 95-101.

5 Katoh M (2008). WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. *Curr. Drug Targets.* 9, 565-570.

Katoh M, Katoh M (2007). STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review). *Int J Mol. Med* 19, 273-278.

10 Kawata H, Shimada N, Kamiakito T, Komatsu K, Morita T, Ota T, Obayashi M, Shitara K, Tanaka A (2012). RhoC and guanine nucleotide exchange factor Net1 in androgen-unresponsive mouse mammary carcinoma SC-4 cells and human prostate cancer after short-term endocrine therapy. *Prostate* 72, 1071-1079.

15 Kelly SM, Corbett AH (2009). Messenger RNA export from the nucleus: a series of molecular wardrobe changes. *Traffic.* 10, 1199-1208.

Kennedy A, Dong H, Chen D, Chen WT (2009). Elevation of seprase expression and promotion of an invasive phenotype by collagenous matrices in ovarian tumor cells. *Int J Cancer* 124, 27-35.

Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 17-33.

20 Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T, Shimazu K, Morishita Y, Shimazaki M, Kii I, Horie H, Nagai H, Kudo A, Fukayama M (2008). Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J Histochem. Cytochem.* 56, 753-764.

Kim DH, Park SE, Kim M, Ji YI, Kang MY, Jung EH, Ko E, Kim Y, Kim S, Shim YM, Park J (2011). A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers. *Cancer* 117, 4080-4091.

25 Kim EH, Park AK, Dong SM, Ahn JH, Park WY (2010a). Global analysis of CpG methylation reveals epigenetic control of the radiosensitivity in lung cancer cell lines. *Oncogene* 29, 4725-4731.

Kim HS, Kim dH, Kim JY, Jeoung NH, Lee IK, Bong JG, Jung ED (2010b). Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. *Korean J Intern. Med.* 25, 399-407.

30 Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massague J (2009). Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139, 1315-1326.

Kim S, Park HS, Son HJ, Moon WS (2004). [The role of angiostatin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and 12 in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma]. *Korean J Hepatol.* 10, 62-72.

35 Kimura J, Kudoh T, Miki Y, Yoshida K (2011). Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *Int. J Cancer* 128, 1524-1531.

40 Kloth JN, Oosting J, van WT, Szuhai K, Knijnenburg J, Gorter A, Kenter GG, Fleuren GJ, Jordanova ES (2007). Combined array-comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex genetic alterations in cervical cancer. *BMC. Genomics* 8, 53.

45 Knight HM, Pickard BS, Maclean A, Malloy MP, Soares DC, McRae AF, Condie A, White A, Hawkins W, McGhee K, van BM, MacIntyre DJ, Starr JM, Deary IJ, Visscher PM, Porteous DJ, Cannon RE, St CD, Muir WJ, Blackwood DH (2009). A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am J Hum. Genet.* 85, 833-846.

50 Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Traskelin AL, Perveen R, Kivittie-Kallio S, Norio R, Warburg M, Fryns JP, de la Chapelle A, Lehesjoki AE (2003). Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am. J Hum. Genet.* 72, 1359-1369.

Konishi N, Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Ota I, Tanaka N, Fujimoto K (2008). Function of JunB in transient amplifying cell senescence and progression of human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 14, 4408-4416.

55 Kornak U, Brancati F, Le MM, Lichtenbelt K, Hohne W, Tinschert S, Garaci FG, Dallapiccola B, Nurnberg P (2010). Three novel mutations in the ANK membrane protein cause craniometaphyseal dysplasia with variable conductive hearing loss. *Am. J Med. Genet. A* 152A, 870-874.

Korosec B, Glavac D, Rott T, Ravnik-Glavac M (2006). Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 171, 105-111.

Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, Merseburger AS, Soloway M, Lokeshwar VB (2010). Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer*.

5 Krieg AM (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 471-484.

Kuang P, Zhou C, Li X, Ren S, Li B, Wang Y, Li J, Tang L, Zhang J, Zhao Y (2012). Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase 2 as a potential biomarker for predicting cisplatin efficacy in advanced NSCLC patients. *Lung Cancer* 77, 427-432.

10 Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, Wei Y, Jelinek J, Issa JP, Garcia-Manero G (2008). Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 22, 1529-1538.

Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, Kitagawa M, Kawai H, Gaffney PM, Miyauchi M, Takata T (2006). Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Res* 66, 6928-6935.

15 Kwon OH, Park JL, Kim M, Kim JH, Lee HC, Kim HJ, Noh SM, Song KS, Yoo HS, Paik SG, Kim SY, Kim YS (2011). Aberrant up-regulation of LAMB3 and LAMC2 by promoter demethylation in gastric cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406, 539-545.

20 Kwon YJ, Lee SJ, Koh JS, Kim SH, Kim YJ, Park JH (2009). Expression patterns of aurora kinase B, heat shock protein 47, and periostin in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Res* 18, 141-151.

Labied S, Galant C, Nisolle M, Ravet S, Munaut C, Marbaix E, Foidart JM, Franken F (2009). Differential elevation of matrix metalloproteinase expression in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time. *Hum. Reprod.* 24, 113-121.

25 Lau E, Zhu C, Abraham RT, Jiang W (2006). The functional role of Cdc6 in S-G2/M in mammalian cells. *EMBO Rep.* 7, 425-430.

Lazaris AC, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, Golematis BC (1997). Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res. Treat.* 43, 43-51.

30 Le CB, Rynkowski M, Le MM, Bruyere C, Lonz C, Gras T, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Ruysschaert JM, Kiss R, Lefranc F (2010). Long-term in vitro treatment of human glioblastoma cells with temozolomide increases resistance in vivo through up-regulation of GLUT transporter and aldo-keto reductase enzyme AKR1C expression. *Neoplasia*. 12, 727-739.

Lee KH, Kim JR (2012). Regulation of HGF-mediated cell proliferation and invasion through NF-kappaB, JunB, and MMP-9 cascades in stomach cancer cells. *Clin Exp. Metastasis* 29, 263-272.

35 Lee WS, Jain MK, Arkonac BM, Zhang D, Shaw SY, Kashiki S, Maemura K, Lee SL, Hollenberg NK, Lee ME, Haber E (1998). Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. *Circ. Res* 82, 845-851.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

40 Lefave CV, Squatrito M, Vorlova S, Rocco GL, Brennan CW, Holland EC, Pan YX, Cartegni L (2011). Splicing factor hnRNPH drives an oncogenic splicing switch in gliomas. *EMBO J* 30, 4084-4097.

45 Leivo I, Jee KJ, Heikinheimo K, Laine M, Ollila J, Nagy B, Knuutila S (2005). Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation. *Cancer Genet. Cytogenet.* 156, 104-113.

Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD, Rammensee HG, Stevanovic S (2004). Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.* 22, 450-454.

50 Li H, Guo L, Li J, Liu N, Liu J (2000a). Alternative splicing of RHAMM gene in chinese gastric cancers and its in vitro regulation. *Zhonghua Yi. Xue. Yi. Chuan Xue. Za Zhi.* 17, 343-347.

Li H, Guo L, Li JW, Liu N, Qi R, Liu J (2000b). Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumor progression. *Int J Oncol* 17, 927-932.

55 Li HG, Han JJ, Huang ZQ, Wang L, Chen WL, Shen XM (2011). IMP3 is a novel biomarker to predict metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma. *J Craniofac. Surg.* 22, 2022-2025.

Li J, Ying J, Fan Y, Wu L, Ying Y, Chan AT, Srivastava G, Tao Q (2010). WNT5A antagonizes WNT/beta-catenin signaling and is frequently silenced by promoter CpG methylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 10, 617-624.

Li Y, Chu LW, LI Z, Yik PY, Song YQ (2009). A study on the association of the chromosome 12p13 locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* 27, 508-512.

5 Liang WJ, Qiu F, Hong MH, Guo L, Qin HD, Liu QC, Zhang XS, Mai HQ, Xiang YQ, Min HQ, Zeng YX (2008). [Differentially expressed genes between upward and downward progressing types of nasopharyngeal carcinoma]. *Ai. Zheng.* 27, 460-465.

Liao B, Hu Y, Brewer G (2011). RNA-binding protein insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP-3) promotes cell survival via insulin-like growth factor II signaling after ionizing radiation. *J Biol. Chem.* 286, 31145-31152.

10 Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G (2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J Biol. Chem.* 280, 18517-18524.

15 Lin DM, Ma Y, Xiao T, Guo SP, Han NJ, Su K, Yi SZ, Fang J, Cheng SJ, Gao YN (2006). [TPX2 expression and its significance in squamous cell carcinoma of lung]. *Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi.* 35, 540-544.

Litjens SH, de Pereda JM, Sonnenberg A (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol.* 16, 376-383.

Liu J, Yang L, Jin M, Xu L, Wu S (2011a). regulation of the invasion and metastasis of human glioma cells by polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. *Mol. Med. Rep.* 4, 1299-1305.

20 Liu T, Jin X, Zhang X, Yuan H, Cheng J, Lee J, Zhang B, Zhang M, Wu J, Wang L, Tian G, Wang W (2012). A novel missense SNRNP200 mutation associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Chinese family. *PLoS. ONE.* 7, e45464.

25 Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R, Krschek B, Zou L, Kim JE, Kitakaze M, Miyamoto S, Nagata K, Hashimoto N, Koizumi A (2011b). Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS. ONE.* 6, e22542.

Lleres D, Denegri M, Biggiogera M, Ajuh P, Lamond AI (2010). Direct interaction between hnRNP-M and CDC5L/PLRG1 proteins affects alternative splice site choice. *EMBO Rep.* 11, 445-451.

30 Lu D, Yang X, Jiang NY, Woda BA, Liu Q, Dresser K, Mercurio AM, Rock KL, Jiang Z (2011). IMP3, a new biomarker to predict progression of cervical intraepithelial neoplasia into invasive cancer. *Am. J Surg. Pathol.* 35, 1638-1645.

35 Lu Z, Zhou L, Killela P, Rasheed AB, Di C, Poe WE, McLendon RE, Bigner DD, Nicchitta C, Yan H (2009). Glioblastoma proto-oncogene SEC61gamma is required for tumor cell survival and response to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* 69, 9105-9111.

Lugassy C, Torres-Munoz JE, Kleinman HK, Ghanem G, Vernon S, Barnhill RL (2009). Overexpression of malignancy-associated laminins and laminin receptors by angiogenic human melanoma cells in a chick chorioallantoic membrane model. *J Cutan. Pathol.* 36, 1237-1243.

40 Ma LJ, Li W, Zhang X, Huang DH, Zhang H, Xiao JY, Tian YQ (2009). Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Arch. Med Res* 40, 114-123.

Ma TS, Mann DL, Lee JH, Gallinghouse GJ (1999). SR compartment calcium and cell apoptosis in SERCA overexpression. *Cell Calcium* 26, 25-36.

45 Ma Y, Lin D, Sun W, Xiao T, Yuan J, Han N, Guo S, Feng X, Su K, Mao Y, Cheng S, Gao Y (2006). Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1121-1127.

MacLennan DH, Rice WJ, Green NM (1997). The mechanism of Ca<sup>2+</sup>-transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *J Biol. Chem.* 272, 28815-28818.

50 Maeder C, Kutach AK, Guthrie C (2009). ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. *Nat Struct. Mol. Biol.* 16, 42-48.

Manda R, Kohno T, Niki T, Yamada T, Takenoshita S, Kuwano H, Yokota J (2000). Differential expression of the LAMB3 and LAMC2 genes between small cell and non-small cell lung carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 440-445.

55 Marchand M, Van BN, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De GJ, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der BP, Boon T (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int. J. Cancer* 80, 219-230.

- Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y, . (1995). Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int. J Cancer* 63, 883-885.
- Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA (2006). Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 291, G45-G54.
- McManus KJ, Barrett IJ, Nouhi Y, Hieter P (2009). Specific synthetic lethal killing of RAD54B-deficient human colorectal cancer cells by FEN1 silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 3276-3281.
- Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*. 5, 649-662.
- Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S, Chouchane L (2001). Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* 91, 672-678.
- Meyer EL, Goemann IM, Dora JM, Wagner MS, Maia AL (2008). Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in medullary thyroid carcinoma. *Mol. Cell Endocrinol.* 289, 16-22.
- Miller NH, Justice CM, Marosy B, Swindle K, Kim Y, Roy-Gagnon MH, Sung H, Behneman D, Doheny KF, Pugh E, Wilson AF (2012). Intra-familial tests of association between familial idiopathic scoliosis and linked regions on 9q31.3-q34.3 and 16p12.3-q22.2. *Hum. Hered.* 74, 36-44.
- Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, Hope C, Holcombe RF (2004). Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. *Int. J Oncol* 25, 1337-1342.
- Mochizuki S, Okada Y (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 98, 621-628.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science*.
- Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL (1997). HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. *Transplantation* 64, 1017-1027.
- Moroy G, Alix AJ, Sapi J, Hornebeck W, Bourguet E (2012). Neutrophil elastase as a target in lung cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 12, 565-579.
- Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER (2010). Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene* 29, 2104-2117.
- Moss DK, Wilde A, Lane JD (2009). Dynamic release of nuclear RanGTP triggers TPX2-dependent microtubule assembly during the apoptotic execution phase. *J Cell Sci.* 122, 644-655.
- Murakami M, Araki O, Morimura T, Hosoi Y, Mizuma H, Yamada M, Kurihara H, Ishiuchi S, Tamura M, Sasaki T, Mori M (2000). Expression of type II iodothyronine deiodinase in brain tumors. *J Clin Endocrinol. Metab* 85, 4403-4406.
- Nakamura Y, Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sakai D, Mochida J, Hotta T, Ando K (2006). Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br. J Dermatol.* 154, 1062-1070.
- Neidert MC, Schoor O, Trautwein C, Trautwein N, Christ L, Melms A, Honegger J, Rammensee HG, Herold-Mende C, Dietrich PY, Stevanovic S (2012). Natural HLA class I ligands from glioblastoma: extending the options for immunotherapy. *J Neurooncol.*
- Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 4, 328-332.
- Niedergethmann M, Alves F, Neff JK, Heidrich B, Aramin N, Li L, Pilarsky C, Grutzmann R, Allgayer H, Post S, Gretz N (2007). Gene expression profiling of liver metastases and tumour invasion in pancreatic cancer using an orthotopic SCID mouse model. *Br. J Cancer* 97, 1432-1440.
- Nikolova DN, Zembutsu H, Sechanov T, Vidinov K, Kee LS, Ivanova R, Becheva E, Kocova M, Toncheva D, Nakamura Y (2008). Genome-wide gene expression profiles of thyroid carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of thyroid carcinoma. *Oncol Rep.* 20, 105-121.
- Nirde P, Derocq D, Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gary-Bobo M, Garcia M (2010). Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. *Oncogene* 29, 117-127.
- Nishinakamura R, Uchiyama Y, Sakaguchi M, Fujimura S (2011). Nephron progenitors in the metanephric mesenchyme. *Pediatr. Nephrol.* 26, 1463-1467.

Odermatt A, Taschner PE, Khanna VK, Busch HF, Karpati G, Jablecki CK, Breuning MH, MacLennan DH (1996). Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, are associated with Brody disease. *Nat Genet.* 14, 191-194.

5 Oh SP, Taylor RW, Gerecke DR, Rochelle JM, Seldin MF, Olsen BR (1992). The mouse alpha 1(XII) and human alpha 1(XII)-like collagen genes are localized on mouse chromosome 9 and human chromosome 6. *Genomics* 14, 225-231.

Ohta S, Koide M, Tokuyama T, Yokota N, Nishizawa S, Namba H (2001). Cdc6 expression as a marker of proliferative activity in brain tumors. *Oncol Rep.* 8, 1063-1066.

10 Ortega P, Moran A, Fernandez-Marcelo T, De JC, Frias C, Lopez-Asenjo JA, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Diaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M (2010). MMP-7 and SGCE as distinctive molecular factors in sporadic colorectal cancers from the mutator phenotype pathway. *Int. J Oncol* 36, 1209-1215.

Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 529-550.

15 Pascolo S, Ginhoux F, Laham N, Walter S, Schoor O, Probst J, Rohrlrich P, Obermayr F, Fisch P, Danos O, Ehrlich R, Lemonnier FA, Rammensee HG (2005). 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, 117-122.

Pascreau G, Eckerdt F, Lewellyn AL, Prigent C, Maller JL (2009). Phosphorylation of p53 is regulated by TPX2-Aurora A in xenopus oocytes. *J Biol. Chem.* 284, 5497-5505.

Patterson CE, Abrams WR, Wolter NE, Rosenbloom J, Davis EC (2005). Developmental regulation and coordinate reexpression of FKBP65 with extracellular matrix proteins after lung injury suggest a specialized function for this endoplasmic reticulum immunophilin. *Cell Stress. Chaperones.* 10, 285-295.

25 Patterson CE, Schaub T, Coleman EJ, Davis EC (2000). Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Mol. Biol. Cell* 11, 3925-3935.

Peiro G, Diebold J, Baretton GB, Kimmig R, Lohrs U (2001). Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome. *Int. J Gynecol. Pathol.* 20, 359-367.

30 Peng C, Togayachi A, Kwon YD, Xie C, Wu G, Zou X, Sato T, Ito H, Tachibana K, Kubota T, Noce T, Narimatsu H, Zhang Y (2010). Identification of a novel human UDP-GalNAc transferase with unique catalytic activity and expression profile. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 680-686.

35 Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, Ratnam K (2000). Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem. J* 351, 67-77.

Perrin-Tricaud C, Rutschmann C, Hennen T (2011). Identification of domains and amino acids essential to the collagen galactosyltransferase activity of GLT25D1. *PLoS. ONE.* 6, e29390.

40 Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, Chaturvedi AK, Katki HA, Zheng YL, Bowman ED, Engels EA, Caporaso NE, Harris CC (2011). Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 103, 1112-1122.

Piskac-Collier AL, Monroy C, Lopez MS, Cortes A, Etzel CJ, Greisinger AJ, Spitz MR, El-Zein RA (2011). Variants in folate pathway genes as modulators of genetic instability and lung cancer risk. *Genes Chromosomes. Cancer* 50, 1-12.

45 Pontisso P, Calabrese F, Benvegna L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fassina G (2004). Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Br. J Cancer* 90, 833-837.

50 Prades C, Arnould I, Annilo T, Shulenin S, Chen ZQ, Orosco L, Triunfol M, Devaud C, Maintoux-Larois C, Lafargue C, Lemoine C, Deneffe P, Rosier M, Dean M (2002). The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058 amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon. *Cytogenet. Genome Res* 98, 160-168.

55 Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, Thelma BK (2010). Association analysis of ADPRT1, AKR1B1, RAGE, GFPT2 and PAI-1 gene polymorphisms with chronic renal insufficiency among Asian Indians with type-2 diabetes. *BMC. Med. Genet.* 11, 52.

Puppini C, Fabbro D, Dima M, Di LC, Puxeddu E, Filetti S, Russo D, Damante G (2008). High periostin expression correlates with aggressiveness in papillary thyroid carcinomas. *J Endocrinol.* 197, 401-408.

60 Purdue MP, Johansson M, Zelenika D, Toro JR, Scelo G, Moore LE, Prokhortchouk E, Wu X, Kiemeny LA, Gaborieau V, Jacobs KB, Chow WH, Zaridze D, Matveev V, Lubinski J, Trubicka J,

- Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Bucur A, Bencko V, Foretova L, Janout V, Boffetta P, Colt JS, Davis FG, Schwartz KL, Banks RE, Selby PJ, Harnden P, Berg CD, Hsing AW, Grubb RL, III, Boeing H, Vineis P, Clavel-Chapelon F, Palli D, Tumino R, Krogh V, Panico S, Duell EJ, Quiros JR, Sanchez MJ, Navarro C, Ardanaz E, Dorronsoro M, Khaw KT, Allen NE, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Trichopoulos D, Linseisen J, Ljungberg B, Overvad K, Tjonneland A, Romieu I, Riboli E, Mukeria A, Shangina O, Stevens VL, Thun MJ, Diver WR, Gapstur SM, Pharoah PD, Easton DF, Albanes D, Weinstein SJ, Virtamo J, Vatten L, Hveem K, Njolstad I, Tell GS, Stoltenberg C, Kumar R, Koppova K, Cussenot O, Benhamou S, Oosterwijk E, Vermeulen SH, Aben KK, van der Marel SL, Ye Y, Wood CG, Pu X, Mazur AM, Boulygina ES, Chekanov NN, Foglio M, Lechner D, Gut I, Heath S, Blanche H, Hutchinson A, Thomas G, Wang Z, Yeager M, Fraumeni JF, Jr., Skryabin KG, McKay JD, Rothman N, Chanock SJ, Lathrop M, Brennan P (2011). Genome-wide association study of renal cell carcinoma identifies two susceptibility loci on 2p21 and 11q13.3. *Nat Genet.* 43, 60-65.
- Puyol M, Martin A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, Guerra C, Santamaria D, Barbacid M (2010). A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 18, 63-73.
- Qu P, Du H, Wang X, Yan C (2009). Matrix metalloproteinase 12 overexpression in lung epithelial cells plays a key role in emphysema to lung bronchioalveolar adenocarcinoma transition. *Cancer Res* 69, 7252-7261.
- Ramakrishna M, Williams LH, Boyle SE, Bearfoot JL, Sridhar A, Speed TP, Gorringer KL, Campbell IG (2010). Identification of candidate growth promoting genes in ovarian cancer through integrated copy number and expression analysis. *PLoS. ONE.* 5, e9983.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bacher OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs.* (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- Rao B, Gao Y, Huang J, Gao X, Fu X, Huang M, Yao J, Wang J, Li W, Zhang J, Liu H, Wang L, Wang J (2011). Mutations of p53 and K-ras correlate TF expression in human colorectal carcinomas: TF downregulation as a marker of poor prognosis. *Int. J Colorectal Dis.* 26, 593-601.
- Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12, 1231-1245.
- Rauch J, O'Neill E, Mack B, Matthias C, Munz M, Kolch W, Gires O (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H blocks MST2-mediated apoptosis in cancer cells by regulating A-Raf transcription. *Cancer Res.* 70, 1679-1688.
- Rege TA, Hagood JS (2006a). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* 20, 1045-1054.
- Rege TA, Hagood JS (2006b). Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 991-999.
- Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Ozer HL, Schwab M, Albino AP, Old LJ (1993). Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. *Cancer Res* 53, 3327-3335.
- Rettig WJ, Su SL, Fortunato SR, Scanlan MJ, Raj BK, Garin-Chesa P, Healey JH, Old LJ (1994). Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors. *Int J Cancer* 58, 385-392.
- Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ (2006). 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, 67-74.
- Ripka S, Konig A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, Downward J, Gress T, Michl P (2007). WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28, 1178-1187.
- Rivera VT, Boudoukha S, Simon A, Souidi M, Cuvellier S, Pinna G, Poleskaya A (2013). Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization. *Oncogene.*
- Rodningen OK, Borresen-Dale AL, Alsner J, Hastie T, Overgaard J (2008). Radiation-induced gene expression in human subcutaneous fibroblasts is predictive of radiation-induced fibrosis. *Radiother. Oncol* 86, 314-320.
- Rodriguez CI, Stewart CL (2007). Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. *Dev. Biol.* 312, 501-508.



- Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Roigas J, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K, Lichtinghagen R (2004a). Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. *Oncol Rep.* 11, 529-536.
- Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Stephan C, Roigas J, Kristiansen G, Loening SA, Lichtinghagen R, Jung K (2004b). The membrane proteases adams and hepsin are differentially expressed in renal cell carcinoma. Are they potential tumor markers? *J Urol.* 172, 2162-2166.
- Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev.* 19, 570-582.
- Romagnoli S, Fasoli E, Vaira V, Falleni M, Pellegrini C, Catania A, Roncalli M, Marchetti A, Santambrogio L, Coggi G, Bosari S (2009). Identification of potential therapeutic targets in malignant mesothelioma using cell-cycle gene expression analysis. *Am J Pathol.* 174, 762-770.
- Romero-Weaver AL, Wang HW, Steen HC, Scarzello AJ, Hall VL, Sheikh F, Donnelly RP, Gamero AM (2010). Resistance to IFN-alpha-induced apoptosis is linked to a loss of STAT2. *Mol. Cancer Res.* 8, 80-92.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, . (1987). 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, 889-897.
- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, . (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J Med* 319, 1676-1680.
- Ruan K, Bao S, Ouyang G (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 2219-2230.
- Ruiz dA, I, Scarselli M, Rosemond E, Gautam D, Jou W, Gavrilova O, Ebert PJ, Levitt P, Wess J (2010). RGS4 is a negative regulator of insulin release from pancreatic beta-cells in vitro and in vivo. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 7999-8004.
- Rusin M, Zientek H, Krzesniak M, Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S, Butkiewicz D, Vaitiekunaite R, Lisowska K, Grzybowska E, Krawczyk Z (2004). Intronic polymorphism (1541-1542delGT) of the constitutive heat shock protein 70 gene has functional significance and shows evidence of association with lung cancer risk. *Mol. Carcinog.* 39, 155-163.
- Sagara N, Toda G, Hirai M, Terada M, Katoh M (1998). Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 117-122.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakuntabhai A, Ruiz-Perez V, Carter S, Jacobsen N, Burge S, Monk S, Smith M, Munro CS, O'Donovan M, Craddock N, Kucherlapati R, Rees JL, Owen M, Lathrop GM, Monaco AP, Strachan T, Hovnanian A (1999). Mutations in ATP2A2, encoding a Ca<sup>2+</sup>-pump, cause Darier disease. *Nat Genet.* 21, 271-277.
- Samanta S, Sharma VM, Khan A, Mercurio AM (2012). Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta: implications for triple-negative breast cancer. *Oncogene* 31, 4689-4697.
- Sang QX (1998). Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* 8, 171-177.
- Sarai N, Kagawa W, Fujikawa N, Saito K, Hikiba J, Tanaka K, Miyagawa K, Kurumizaka H, Yokoyama S (2008). Biochemical analysis of the N-terminal domain of human RAD54B. *Nucleic Acids Res.* 36, 5441-5450.
- Satow R, Shitashige M, Kanai Y, Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T (2010). Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 16, 2518-2528.
- Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JH, Old LJ, Rettig WJ (1994). Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 5657-5661.
- Schafer R, Sedehizade F, Welte T, Reiser G (2003). ATP-and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 285, L376-L385.
- Schegg B, Hulsmeier AJ, Rutschmann C, Maag C, Hennot T (2009). Core glycosylation of collagen is initiated by two beta(1-O)galactosyltransferases. *Mol. Cell Biol.* 29, 943-952.

- Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, Fehm T, Solomayer E, Riess O, Wallwiener D, Kurek R, Neubauer HJ (2006). Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 66, 5278-5286.
- 5 Scieglińska D, Pigłowski W, Mazurek A, Malusecka E, Zebracka J, Filipczak P, Krawczyk Z (2008). The HspA2 protein localizes in nucleoli and centrosomes of heat shocked cancer cells. *J Cell Biochem.* 104, 2193-2206.
- Seifert W, Kuhnisch J, Maritzen T, Horn D, Haucke V, Hennies HC (2011). Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J Biol. Chem.* 286, 37665-37675.
- 10 Shaulian E (2010). AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal.* 22, 894-899.
- Shaulian E, Karin M (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 4, E131-E136.
- Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ (2003). Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 3, 377-386.
- 15 Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, Higashikawa K, Kamata N (2009). Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 34, 1565-1571.
- 20 Shimbo T, Tanemura A, Yamazaki T, Tamai K, Katayama I, Kaneda Y (2010). Serum anti-BPAG1 auto-antibody is a novel marker for human melanoma. *PLoS. ONE.* 5, e10566.
- Shyian M, Gryshkova V, Kostianets O, Gorshkov V, Gogolev Y, Goncharuk I, Nespryadko S, Vorobjova L, Filonenko V, Kiyamova R (2011). Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors. *Exp. Oncol* 33, 94-98.
- 25 Siddiqui N, Borden KL (2012). mRNA export and cancer. *Wiley. Interdiscip. Rev. RNA.* 3, 13-25.
- Simpson NE, Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP (2012). An in vitro investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.* 133, 959-968.
- 30 Singh-Jasuja H, Emmerich NP, Rammensee HG (2004). The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 187-195.
- Siow DL, Wattenberg BW (2012). Mammalian ORMDL proteins mediate the feedback response in ceramide biosynthesis. *J Biol. Chem.* 287, 40198-40204.
- Slack FJ, Weidhaas JB (2008). MicroRNA in cancer prognosis. *N. Engl. J Med.* 359, 2720-2722.
- 35 Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Herschberg RM (2006). 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, 3089-3094.
- Smith MJ, Culhane AC, Donovan M, Coffey JC, Barry BD, Kelly MA, Higgins DG, Wang JH, Kirwan WO, Cotter TG, Redmond HP (2009a). Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification. *Br. J Cancer* 100, 1452-1464.
- Smith SC, Nicholson B, Nitz M, Frierson HF, Jr., Smolkin M, Hampton G, El-Rifai W, Theodorescu D (2009b). Profiling bladder cancer organ site-specific metastasis identifies LAMC2 as a novel biomarker of hematogenous dissemination. *Am J Pathol.* 174, 371-379.
- 45 Sohr S, Engeland K (2008). RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* 7, 3448-3460.
- Somers GR, Bradbury R, Trute L, Conigrave A, Venter DJ (1999). Expression of the human P2Y6 nucleotide receptor in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Lab Invest* 79, 131-139.
- 50 Srougi MC, BurrIDGE K (2011). The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS. ONE.* 6, e17108.
- Staehler M, Stenzl A, Dietrich PY, Eisen T, Haferkamp A, Beck J, Mayer A, Walter S, Singh-Jasuja H, Stief C (2007). A phase I study to evaluate safety, immunogenicity and anti-tumor activity of the multi-peptide vaccine IMA901 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 (Abstract).*
- 55 Starzyk RM, Rosenow C, Frye J, Leismann M, Rodzinski E, Putney S, Tuomanen EI (2000). Cerebral cell adhesion molecule: a novel leukocyte adhesion determinant on blood-brain barrier capillary endothelium. *J Infect. Dis.* 181, 181-187.
- Steckelbroeck S, Jin Y, Gopishetty S, Oyesanmi B, Penning TM (2004). Human cytosolic 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3beta-
- 60

hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. *J Biol. Chem.* 279, 10784-10795.

Stewart DJ (2010). Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Crit Rev. Oncol Hematol.* 75, 173-234.

5 Stuart JE, Lusk EA, Scheck AC, Coons SW, Lal A, Perry A, Gutmann DH (2010). Identification of Gene Markers Associated With Aggressive Meningioma by Filtering Across Multiple Sets of Gene Expression Arrays. *J Neuropathol. Exp. Neurol.*

Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, Kato H (1991). Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 51-58.

10 Sunaga N, Imai H, Shimizu K, Shames DS, Kakegawa S, Girard L, Sato M, Kaira K, Ishizuka T, Gazdar AF, Minna JD, Mori M (2012). Oncogenic KRAS-induced interleukin-8 overexpression promotes cell growth and migration and contributes to aggressive phenotypes of non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 130, 1733-1744.

15 Sutherland ME, Nishimori I, Caffrey T, Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mack D, Iwamura T, Clausen H, Hollingsworth MA (1997). Expression of three UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyltransferases in adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 57, 4744-4748.

20 Suvasini R, Shruti B, Thota B, Shinde SV, Friedmann-Morvinski D, Nawaz Z, Prasanna KV, Thennarasu K, Hegde AS, Arivazhagan A, Chandramouli BA, Santosh V, Somasundaram K (2011). Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2. *J Biol. Chem.* 286, 25882-25890.

25 Tai CJ, Shen SC, Lee WR, Liao CF, Deng WP, Chiou HY, Hsieh CI, Tung JN, Chen CS, Chiou JF, Li LT, Lin CY, Hsu CH, Jiang MC (2010). Increased cellular apoptosis susceptibility (CSE1L/CAS) protein expression promotes protrusion extension and enhances migration of MCF-7 breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 316, 2969-2981.

Takanami I, Abiko T, Koizumi S (2008). Expression of periostin in patients with non-small cell lung cancer: correlation with angiogenesis and lymphangiogenesis. *Int J Biol. Markers* 23, 182-186.

30 Tanaka S, Akiyoshi T, Mori M, Wands JR, Sugimachi K (1998). A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/beta-catenin signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10164-10169.

Tanaka T, Ohkubo S, Tatsuno I, Prives C (2007). hCAS/CSE1L associates with chromatin and regulates expression of select p53 target genes. *Cell* 130, 638-650.

35 Terabayashi T, Sakaguchi M, Shinmyozu K, Ohshima T, Johjima A, Ogura T, Miki H, Nishinakamura R (2012). Phosphorylation of Kif26b promotes its polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation during kidney development. *PLoS. ONE.* 7, e39714.

40 Terry KL, Vitonis AF, Hernandez D, Lurie G, Song H, Ramus SJ, Titus-Ernstoff L, Carney ME, Wilkens LR, Gentry-Maharaj A, Menon U, Gayther SA, Pharaoh PD, Goodman MT, Cramer DW, Birrer MJ (2010). A polymorphism in the GALNT2 gene and ovarian cancer risk in four population based case-control studies. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 1, 272-277.

Thierry L, Geiser AS, Hansen A, Tesche F, Herken R, Miosge N (2004). Collagen types XII and XIV are present in basement membrane zones during human embryonic development. *J Mol. Histol.* 35, 803-810.

45 Thorsen K, Sorensen KD, Brems-Eskildsen AS, Modin C, Gaustadnes M, Hein AM, Kruhoffer M, Laurberg S, Borre M, Wang K, Brunak S, Krainer AR, Topping N, Dyrskjot L, Andersen CL, ORntoft TF (2008). Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis. *Mol. Cell Proteomics.* 7, 1214-1224.

50 Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den DP, Bocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp. Med* 190, 1669-1678.

55 Timar J, Kasler M, Katai J, Soos M, Mathiasz D, Romany A, Patthy L, Kovacs G, Jozsa A, Szilak L, Forrai T (2006). [Developments in cancer management by innovative genomics. 2006 report of the National Cancer Consortium]. *Magy. Onkol.* 50, 349-359.

Tischler V, Fritzsche FR, Wild PJ, Stefan C, Seifert HH, Riener MO, Hermanns T, Mortezaei A, Gerhardt J, Schraml P, Jung K, Moch H, Soltermann A, Kristiansen G (2010). Periostin is up-regulated in high grade and high stage prostate cancer. *BMC. Cancer* 10, 273.

Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Keiser AR, Wert SE, Bruno MD, Whitsett JA (2011). Sox2 activates cell proliferation and differentiation in the respiratory epithelium. *Am J Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 101-110.

Tondreau T, Dejeneffe M, Meuleman N, Stamatopoulos B, Delforge A, Martiat P, Bron D, Lagneaux L (2008). Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *BMC. Genomics* 9, 166.

Tong L, Harwood HJ, Jr. (2006). Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. *J Cell Biochem.* 99, 1476-1488.

Tong WG, Wierda WG, Lin E, Kuang SQ, Bekele BN, Estrov Z, Wei Y, Yang H, Keating MJ, Garcia-Manero G (2010). Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics.* 5, 499-508.

Torre GC (1998). SCC antigen in malignant and nonmalignant squamous lesions. *Tumour. Biol.* 19, 517-526.

Tritz R, Hickey MJ, Lin AH, Hadwiger P, Sah DW, Neuwelt EA, Mueller BM, Kruse CA (2009). FAPP2 gene downregulation increases tumor cell sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 167-171.

Tsai JR, Chong IW, Chen YH, Yang MJ, Sheu CC, Chang HC, Hwang JJ, Hung JY, Lin SR (2007). Differential expression profile of MAGE family in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 56, 185-192.

Tseng H (1998). Basonuclin, a zinc finger protein associated with epithelial expansion and proliferation. *Front Biosci.* 3, D985-D988.

Tseng H, Biegel JA, Brown RS (1999). Basonuclin is associated with the ribosomal RNA genes on human keratinocyte mitotic chromosomes. *J Cell Sci.* 112 Pt 18, 3039-3047.

Tseng H, Green H (1994). Association of basonuclin with ability of keratinocytes to multiply and with absence of terminal differentiation. *J Cell Biol.* 126, 495-506.

Tsuji A, Kikuchi Y, Sato Y, Koide S, Yuasa K, Nagahama M, Matsuda Y (2006). A proteomic approach reveals transient association of reticulocalbin-3, a novel member of the CREC family, with the precursor of subtilisin-like proprotein convertase, PACE4. *Biochem. J* 396, 51-59.

Tsukamoto Y, Uchida T, Karnan S, Noguchi T, Nguyen LT, Tanigawa M, Takeuchi I, Matsuura K, Hijiya N, Nakada C, Kishida T, Kawahara K, Ito H, Murakami K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M (2008). Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. *J Pathol.* 216, 471-482.

Twarock S, Tammi MI, Savani RC, Fischer JW (2010). Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. *J Biol. Chem.* 285, 23276-23284.

Twells RC, Metzker ML, Brown SD, Cox R, Garey C, Hammond H, Hey PJ, Levy E, Nakagawa Y, Philips MS, Todd JA, Hess JF (2001). The sequence and gene characterization of a 400-kb candidate region for IDDM4 on chromosome 11q13. *Genomics* 72, 231-242.

Tzankov A, Strasser U, Dirnhofer S, Menter T, Arber C, Jotterand M, Roivo A, Tichelli A, Stauder R, Gunthert U (2011). In situ RHAMM protein expression in acute myeloid leukemia blasts suggests poor overall survival. *Ann Hematol.*

Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, Inenaga T, Inoue S, Kobayashi C, Oshima N, Kiyonari H, Nakagata N, Sato Y, Sekiguchi K, Miki H, Araki E, Fujimura S, Tanaka SS, Nishinakamura R (2010). Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 9240-9245.

Ullman E, Pan JA, Zong WX (2011). Squamous cell carcinoma antigen 1 promotes caspase-8-mediated apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress while inhibiting necrosis induced by lysosomal injury. *Mol. Cell Biol.* 31, 2902-2919.

Uttispan K, Thuwajit P, Abiko Y, Charngkaew K, Paupairoj A, Chau-in S, Thuwajit C (2010). Gene expression profiling of cholangiocarcinoma-derived fibroblast reveals alterations related to tumor progression and indicates periostin as a poor prognostic marker. *Mol. Cancer* 9, 13.

van AM, Schepens M, de BD, Janssen B, Merks G, Geurts van KA (2000). Construction of a 350-kb sequence-ready 11q13 cosmid contig encompassing the markers D11S4933 and D11S546: mapping of 11 genes and 3 tumor-associated translocation breakpoints. *Genomics* 66, 35-42.

Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR (1998). Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J Cancer* 79, 468-475.

Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Vazquez K, Duenas A, Taja L, Mendoza P, Garcia JA, Salcedo M (2005). Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. *BMC. Cancer* 5, 68.

Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718.

Walchli C, Koch M, Chiquet M, Odermatt BF, Trueb B (1994). Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV. *J Cell Sci.* 107 (Pt 2), 669-681.

Wallace AM, Sandford AJ, English JC, Burkett KM, Li H, Finley RJ, Muller NL, Coxson HO, Pare PD, Abboud RT (2008). Matrix metalloproteinase expression by human alveolar macrophages in relation to emphysema. *COPD.* 5, 13-23.

Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* 171, 4974-4978.

Wang C, Rajput S, Watabe K, Liao DF, Cao D (2010a). Acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$  as a novel target for cancer therapy. *Front Biosci. (Schol. Ed)* 2, 515-526.

Wang C, Xu C, Sun M, Luo D, Liao DF, Cao D (2009a). Acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$  inhibitor TOFA induces human cancer cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 302-306.

Wang HW, Lin CP, Chiu JH, Chow KC, Kuo KT, Lin CS, Wang LS (2007). Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. *Int. J Cancer* 120, 2019-2027.

Wang J, Tsui HW, Beier F, Pritzker KP, Inman RD, Tsui FW (2008a). The ANKH DeltaE490Mutation in Calcium Pyrophosphate Dihydrate Crystal Deposition Disease (CPPDD) affects tissue non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP) activities. *Open Rheumatol. J* 2, 23-30.

Wang KK, Liu N, Radulovich N, Wigle DA, Johnston MR, Shepherd FA, Minden MD, Tsao MS (2002). Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogene* 21, 7598-7604.

Wang Q, Traynor JR (2011). Opioid-induced down-regulation of RGS4: role of ubiquitination and implications for receptor cross-talk. *J Biol. Chem.* 286, 7854-7864.

Wang SZ, Luo XG, Shen J, Zou JN, Lu YH, Xi T (2008b). Knockdown of SMYD3 by RNA interference inhibits cervical carcinoma cell growth and invasion in vitro. *BMB. Rep.* 41, 294-299.

Wang WX, Zhang WJ, Peng ZL, Yang KX (2009b). [Expression and clinical significance of CDC6 and hMSH2 in cervical carcinoma]. *Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban.* 40, 857-860.

Wang Y, Zhou F, Wu Y, Xu D, Li W, Liang S (2010b). The relationship between three heat shock protein 70 gene polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Clin Chem. Lab Med.* 48, 1657-1663.

Warner SL, Stephens BJ, Nwokenkwo S, Hostetter G, Sugeng A, Hidalgo M, Trent JM, Han H, Von Hoff DD (2009). Validation of TPX2 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 15, 6519-6528.

Watanabe M, Takemasa I, Kawaguchi N, Miyake M, Nishimura N, Matsubara T, Matsuo E, Sekimoto M, Nagai K, Matsuura N, Monden M, Nishimura O (2008). An application of the 2-nitrobenzenesulfonyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma: A novel approach for biomarker discovery. *Proteomics. Clin Appl.* 2, 925-935.

Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H (2011). Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Clin Colorectal Cancer* 10, 134-141.

Watrln E, Legagneux V (2005). Contribution of hCAP-D2, a non-SMC subunit of condensin I, to chromosome and chromosomal protein dynamics during mitosis. *Mol. Cell Biol.* 25, 740-750.

Watt SL, Lunstrum GP, McDonough AM, Keene DR, Burgeson RE, Morris NP (1992). Characterization of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage. *J Biol. Chem.* 267, 20093-20099.

Wawrzynska L, Sakowicz A, Rudzinski P, Langfort R, Kurzyna M (2003). The conversion of thyroxine to triiodothyronine in the lung: comparison of activity of type I iodothyronine 5' deiodinase in lung cancer with peripheral lung tissues. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 59, 140-145.

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279-288.

Weiner L, Green H (1998). Basenuclin as a cell marker in the formation and cycling of the murine hair follicle. *Differentiation* 63, 263-272.

Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S, Rammensee HG (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62, 5818-5827.

Wickramasinghe VO, Stewart M, Laskey RA (2010). GANP enhances the efficiency of mRNA nuclear export in mammalian cells. *Nucleus.* 1, 393-396.

Wildeboer D, Naus S, my Sang QX, Bartsch JW, Pagenstecher A (2006). Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 516-527.

Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, Heath SC, Timpson NJ, Najjar SS, Stringham HM, Strait J, Duren WL, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai G, Swift AJ, Morken MA, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P, Hercberg S, Zelenika D, Chen WM, Li Y, Scott LJ, Scheet PA, Sundvall J, Watanabe RM, Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner AR, Collins R, Bergman RN, Uda M, Tuomilehto J, Cao A, Collins FS, Lakatta E, Lathrop GM, Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke KL, Abecasis GR (2008). Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 40, 161-169.

Winkler GS, Mulder KW, Bardwell VJ, Kalkhoven E, Timmers HT (2006). Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription. *EMBO J* 25, 3089-3099.

Wong CH, Chan H, Ho CY, Lai SK, Chan KS, Koh CG, Li HY (2009). Apoptotic histone modification inhibits nuclear transport by regulating RCC1. *Nat Cell Biol.* 11, 36-45.

Wu A, Wu B, Guo J, Luo W, Wu D, Yang H, Zhen Y, Yu X, Wang H, Zhou Y, Liu Z, Fang W, Yang Z (2011a). Elevated expression of CDK4 in lung cancer. *J Transl. Med.* 9, 38.

Wu GC, Hu HC, Shi MH (2008). [Expression and clinical significance of a disintegrin and metalloprotease 8 (ADAM8) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-small cell lung cancer]. *Ai. Zheng.* 27, 874-878.

Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol. Chem.* 275, 36957-36965.

Wu KD, Lee WS, Wey J, Bungard D, Lytton J (1995). Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. *Am. J Physiol* 269, C775-C784.

Wu SQ, Lv YE, Lin BH, Luo LM, Lv SL, Bi AH, Jia YS (2013). Silencing of periostin inhibits nicotine-mediated tumor cell growth and epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 7, 875-880.

Wu YM, Liu CH, Hu RH, Huang MJ, Lee JJ, Chen CH, Huang J, Lai HS, Lee PH, Hsu WM, Huang HC, Huang MC (2011b). Mucin glycosylating enzyme GALNT2 regulates the malignant character of hepatocellular carcinoma by modifying the EGF receptor. *Cancer Res.* 71, 7270-7279.

Wu Z, Jiang H, Zhang L, Xu X, Zhang X, Kang Z, Song D, Zhang J, Guan M, Gu Y (2012). Molecular analysis of RNF213 gene for moyamoya disease in the Chinese Han population. *PLoS. ONE.* 7, e48179.

Wullner U, Neef I, Eller A, Kleines M, Tur MK, Barth S (2008). Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2. *Curr. Cancer Drug Targets.* 8, 554-565.

Xia LM, Tian DA, Zhang Q, Yan W, Wang B, Liu M, Li PY, Chen B (2008). [Inhibition of HSP70-2 expression by RNA interference induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells]. *Zhonghua Gan Zang. Bing. Za Zhi.* 16, 678-682.

Xiao L, Rao JN, Zou T, Liu L, Marasa BS, Chen J, Turner DJ, Passaniti A, Wang JY (2007). Induced JunD in intestinal epithelial cells represses CDK4 transcription through its proximal promoter region following polyamine depletion. *Biochem. J* 403, 573-581.

Xie Y, Wolff DW, Wei T, Wang B, Deng C, Kirui JK, Jiang H, Qin J, Abel PW, Tu Y (2009). Breast cancer migration and invasion depend on proteasome degradation of regulator of G-protein signaling 4. *Cancer Res* 69, 5743-5751.

Xiong D, Li G, Li K, Xu Q, Pan Z, Ding F, Vedell P, Liu P, Cui P, Hua X, Jiang H, Yin Y, Zhu Z, Li X, Zhang B, Ma D, Wang Y, You M (2012). Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. *Carcinogenesis* 33, 1797-1805.

Yamada H, Yanagisawa K, Tokumaru S, Taguchi A, Nimura Y, Osada H, Nagino M, Takahashi T (2008). Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* 47, 810-818.

Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, Yasui W, Kikuchi A (2010). Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* 29, 2036-2046.

5 Yamazaki H, Nishida H, Iwata S, Dang NH, Morimoto C (2009). CD90 and CD110 correlate with cancer stem cell potentials in human T-acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 383, 172-177.

Yang S, Shin J, Park KH, Jeung HC, Rha SY, Noh SH, Yang WI, Chung HC (2007). Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 1033-1040.

10 Yasmeen A, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C (2003). E-and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 3, 617-633.

Yasukawa M, Ishida K, Yuge Y, Hanaoka M, Minami Y, Ogawa M, Sasaki T, Saito M, Tsuji T (2013). Dpysl4 is involved in tooth germ morphogenesis through growth regulation, polarization and differentiation of dental epithelial cells. *Int. J Biol. Sci.* 9, 382-390.

15 Ye H, Yu T, Temam S, Ziobler BL, Wang J, Schwartz JL, Mao L, Wong DT, Zhou X (2008). Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC. Genomics* 9, 69.

Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD (2002). 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, 16168-16173.

Yoon H, Liyanarachchi S, Wright FA, Davuluri R, Lockman JC, de la CA, Pellegata NS (2002). Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15632-15637.

25 Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M (2010). CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. *J Cell Sci.* 123, 225-235.

Yu JM, Jun ES, Jung JS, Suh SY, Han JY, Kim JY, Kim KW, Jung JS (2007). Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* 257, 172-181.

30 Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, Senturk S, Celik E, Toylu A, Tasdemir N, Yilmaz M, Erdal E, Akcali KC, Atabay N, Ozturk M (2009). Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Cancer* 8, 90.

Zaka R, Dion AS, Kusnierz A, Bohensky J, Srinivas V, Freeman T, Williams CJ (2009). Oxygen tension regulates the expression of ANK (progressive ankylosis) in an HIF-1-dependent manner in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner. Res.* 24, 1869-1878.

35 Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, Soares N, Tsang KY, Schlom J (1997). Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 57, 4570-4577.

Zhang H, Jia Y, Cooper JJ, Hale T, Zhang Z, Elbein SC (2004). Common variants in glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and increased GFPT2 mRNA levels. *J Clin Endocrinol. Metab* 89, 748-755.

Zhang J, Valianou M, Cheng JD (2010a). Identification and characterization of the promoter of fibroblast activation protein. *Front Biosci. (Elite. Ed)* 2, 1154-1163.

45 Zhang X, Berger FG, Yang J, Lu X (2011a). USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1. *EMBO J* 30, 2177-2189.

Zhang Y, Zhang G, Li J, Tao Q, Tang W (2010b). The expression analysis of periostin in human breast cancer. *J Surg Res* 160, 102-106.

50 Zhang ZC, Satterly N, Fontoura BM, Chook YM (2011b). Evolutionary development of redundant nuclear localization signals in the mRNA export factor NXF1. *Mol. Biol. Cell* 22, 4657-4668.

Zhao C, Bellur DL, Lu S, Zhao F, Grassi MA, Bowne SJ, Sullivan LS, Daiger SP, Chen LJ, Pang CP, Zhao K, Staley JP, Larsson C (2009). Autosomal-dominant retinitis pigmentosa caused by a mutation in SNRNP200, a gene required for unwinding of U4/U6 snRNAs. *Am. J Hum. Genet.* 85, 617-627.

55 Zhao Z, Lee CC, Baldini A, Caskey CT (1995). A human homologue of the Drosophila polarity gene frizzled has been identified and mapped to 17q21.1. *Genomics* 27, 370-373.

Zheng PS, Wen J, Ang LC, Sheng W, Vilorio-Petit A, Wang Y, Wu Y, Kerbel RS, Yang BB (2004). Versican/PD-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *FASEB J* 18, 754-756.

60 Zhu CQ, Popova SN, Brown ER, Barsyte-Lovejoy D, Navab R, Shih W, Li M, Lu M, Jurisica I, Penn LZ, Gullberg D, Tsao MS (2007). Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to

enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 11754-11759.

Zhu JH, Hong DF, Song YM, Sun LF, Wang ZF, Wang JW (2013). Suppression of Cellular Apoptosis Susceptibility (CSE1L) Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Asian Pac. J Cancer Prev.* 14, 1017-1021.

Zlobec I, Terracciano L, Tornillo L, Gunthert U, Vuong T, Jass JR, Lugli A (2008). Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer. *Gut* 57, 1413-1419.

Zou JN, Wang SZ, Yang JS, Luo XG, Xie JH, Xi T (2009). Knockdown of SMYD3 by RNA interference down-regulates c-Met expression and inhibits cells migration and invasion induced by HGF. *Cancer Lett.* 280, 78-85.

Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ (2002). Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene* 21, 4855-4862.

Allander SV, Illei PB, Chen Y, Antonescu CR, Bittner M, Ladanyi M, Meltzer PS (2002). Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. *Am. J Pathol.* 161, 1587-1595.

Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, Kumar R, Jenkins RB, de Groen PC, Roche P, van Deursen JM (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet.* 36, 744-749.

Balla A, Kim YJ, Varnai P, Szentpetery Z, Knight Z, Shokat KM, Balla T (2008). Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Mol. Biol. Cell* 19, 711-721.

Barembaum M, Moreno TA, LaBonne C, Sechrist J, Bronner-Fraser M (2000). Noelin-1 is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest. *Nat Cell Biol.* 2, 219-225.

Bhogaraju S, Cajanek L, Fort C, Blisnick T, Weber K, Taschner M, Mizuno N, Lamla S, Bastin P, Nigg EA, Lorentzen E (2013). Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. *Science* 341, 1009-1012.

Blumental-Perry A, Haney CJ, Weixel KM, Watkins SC, Weisz OA, Aridor M (2006). Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. *Dev. Cell* 11, 671-682.

Cantor JM, Ginsberg MH (2012). CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. *J Cell Sci.* 125, 1373-1382.

Cave H, Suci S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, Malet M, Boutard P, Benoit Y, Mauvieux L, Lutz P, Mechinaud F, Grardel N, Mazingue F, Dupont M, Margueritte G, Pages MP, Bertrand Y, Plouvier E, Brunie G, Bastard C, Plantaz D, Vande V, I, Hagemeijer A, Speleman F, Lessard M, Otten J, Vilmer E, Dastugue N (2004). Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), <sup>18</sup>F HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* 103, 442-450.

Chadwick BP, Obermayr F, Frischauf AM (1996). Nuclear cap binding protein maps close to the xeroderma pigmentosum complementation group A (XPA) locus in human and mouse. *Genomics* 35, 632-633.

Cornen S, Guille A, Adelaide J, Addou-Klouche L, Finetti P, Saade MR, Manai M, Carbuccia N, Bekhouche I, Letessier A, Raynaud S, Charafe-Jauffret E, Jacquemier J, Spicuglia S, de TH, Viens P, Bertucci F, Birnbaum D, Chaffanet M (2014). Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. *PLoS. ONE.* 9, e81843.

Dear TN, Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH (1993). The HOX11 gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 4431-4435.

Deves R, Boyd CA (2000). Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J Membr. Biol.* 173, 165-177.

Ferrando AA, Herblot S, Palomero T, Hansen M, Hoang T, Fox EA, Look AT (2004). Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 1909-1911.

Fry AM, Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Tanaka K, Nigg EA (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol.* 141, 1563-1574.

Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C (2007). Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* 5, 1-10.



Garbarino JE, Gibbons IR (2002). Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. *BMC. Genomics* 3, 18.

Gomez-Ferreria MA, Bashkurov M, Mullin M, Gingras AC, Pelletier L (2012). CEP192 interacts physically and functionally with the K63-deubiquitinase CYLD to promote mitotic spindle assembly. *Cell Cycle* 11, 3555-3558.

Gomez-Ferreria MA, Rath U, Buster DW, Chanda SK, Caldwell JS, Rines DR, Sharp DJ (2007). Human Cep192 is required for mitotic centrosome and spindle assembly. *Curr. Biol.* 17, 1960-1966.

Hinck L (2004). The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. *Dev. Cell* 7, 783-793.

Ilboudo A, Nault JC, Dubois-Pot-Schneider H, Corlu A, Zucman-Rossi J, Samson M, Le SJ (2014). Overexpression of phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha is associated with undifferentiated status and poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *BMC. Cancer* 14, 7.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai Y, Nakajima T, Mori M (2009). Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 66, 120-126.

Kataoka N, Ohno M, Kangawa K, Tokoro Y, Shimura Y (1994). Cloning of a complementary DNA encoding an 80 kilodalton nuclear cap binding protein. *Nucleic Acids Res.* 22, 3861-3865.

Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C, Meltzer PS (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med.* 7, 673-679.

Kim HJ, Cho JH, Quan H, Kim JR (2011). Down-regulation of Aurora B kinase induces cellular senescence in human fibroblasts and endothelial cells through a p53-dependent pathway. *FEBS Lett.* 585, 3569-3576.

Kulkarni NH, Karavanich CA, Atchley WR, Anholt RR (2000). Characterization and differential expression of a human gene family of olfactomedin-related proteins. *Genet. Res.* 76, 41-50.

Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O, Hatakeyama K, Ushio Y, Saya H, Hirota T (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev. Cell* 5, 853-864.

Lampson MA, Kapoor TM (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol.* 7, 93-98.

Latil A, Chene L, Cochant-Priollet B, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O (2003). Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int. J Cancer* 103, 306-315.

Lee Y, Yoon KA, Joo J, Lee D, Bae K, Han JY, Lee JS (2013). Prognostic implications of genetic variants in advanced non-small cell lung cancer: a genome-wide association study. *Carcinogenesis* 34, 307-313.

Lemaitre G, Gonnet F, Vaigot P, Gidrol X, Martin MT, Tortajada J, Waksman G (2005). CD98, a novel marker of transient amplifying human keratinocytes. *Proteomics.* 5, 3637-3645.

Lucker BF, Behal RH, Qin H, Siron LC, Taggart WD, Rosenbaum JL, Cole DG (2005). Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits. *J Biol. Chem.* 280, 27688-27696.

Malureanu LA, Jeganathan KB, Hamada M, Wasilewski L, Davenport J, van Deursen JM (2009). BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. *Dev. Cell* 16, 118-131.

Matsuura S, Matsumoto Y, Morishima K, Izumi H, Matsumoto H, Ito E, Tsutsui K, Kobayashi J, Tauchi H, Kajiura Y, Hama S, Kurisu K, Tahara H, Oshimura M, Komatsu K, Ikeuchi T, Kajii T (2006). Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome. *Am. J Med. Genet. A* 140, 358-367.

Mayor T, Hacker U, Stierhof YD, Nigg EA (2002). The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. *J Cell Sci.* 115, 3275-3284.

Minogue S, Waugh MG (2012). The Phosphatidylinositol 4-Kinases: Don't Call it a Comeback. *Subcell. Biochem.* 58, 1-24.

Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Ohira M, Kawarabayasi Y, Ohara O, Tanaka A, Kotani H, Miyajima N, Nomura N (1996). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res.* 3, 321-354.

Narayan G, Goparaju C, Arias-Pulido H, Kaufmann AM, Schneider A, Durst M, Mansukhani M, Pothuri B, Murty VV (2006). Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. *Mol. Cancer* 5, 16.

- Pandey A, Blagoev B, Kratchmarova I, Fernandez M, Nielsen M, Kristiansen TZ, Ohara O, Podtelejnikov AV, Roche S, Lodish HF, Mann M (2002). Cloning of a novel phosphotyrosine binding domain containing molecule, Odin, involved in signaling by receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 21, 8029-8036.
- 5 Perumal D, Singh S, Yoder SJ, Bloom GC, Chellappan SP (2012). A novel five gene signature derived from stem-like side population cells predicts overall and recurrence-free survival in NSCLC. *PLoS. ONE.* 7, e43589.
- Pokrovskaya ID, Willett R, Smith RD, Morelle W, Kudlyk T, Lupashin VV (2011). Conserved oligomeric Golgi complex specifically regulates the maintenance of Golgi glycosylation machinery.
- 10 *Glycobiology* 21, 1554-1569.
- Qian Y, Fritzsche B, Shirasawa S, Chen CL, Choi Y, Ma Q (2001). Formation of brainstem (nor)adrenergic centers and first-order relay visceral sensory neurons is dependent on homeodomain protein Rnx/Tlx3. *Genes Dev.* 15, 2533-2545.
- Reynders E, Foulquier F, Leao TE, Quelhas D, Morelle W, Rabouille C, Annaert W, Matthijs G
- 15 (2009). Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3244-3256.
- Schmid BC, Reznicek GA, Fabjani G, Yoneda T, Leodolter S, Zeillinger R (2007). The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 106, 333-342.
- 20 Sharma G, Mirza S, Prasad CP, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R (2007). Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients. *Life Sci.* 80, 1873-1881.
- Shin J, Gu C, Park E, Park S (2007). Identification of phosphotyrosine binding domain-containing proteins as novel downstream targets of the EphA8 signaling function. *Mol. Cell Biol.* 27, 8113-8126.
- 25 Suzuki M, Shiraishi K, Eguchi A, Ikeda K, Mori T, Yoshimoto K, Ohba Y, Yamada T, Ito T, Baba Y, Baba H (2013). Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 29, 1308-1314.
- Ungar D, Oka T, Brittle EE, Vasile E, Lupashin VV, Chatterton JE, Heuser JE, Krieger M, Waters MG (2002). Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required
- 30 for normal Golgi morphology and function. *J Cell Biol.* 157, 405-415.
- Ungar D, Oka T, Vasile E, Krieger M, Hughson FM (2005). Subunit architecture of the conserved oligomeric Golgi complex. *J Biol. Chem.* 280, 32729-32735.
- Whyte JR, Munro S (2001). The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. *Dev. Cell* 1, 527-537.
- 35 Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Siu NS, Chan SC, Ho TW, Wong KW, Yu MY, Wang VW, Li C, Gardner GJ, Bonome T, Johnson WB, Smith DI, Chung TK, Birrer MJ (2007). Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling. *Oncogene* 26, 1971-1982.
- Wu L, Chang W, Zhao J, Yu Y, Tan X, Su T, Zhao L, Huang S, Liu S, Cao G (2010). Development
- 40 of autoantibody signatures as novel diagnostic biomarkers of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 16, 3760-3768.
- Bobos M, Hytiroglou P, Kostopoulos I, Karkavelas G, Papadimitriou CS (2006). Immunohistochemical distinction between merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. *Am. J Dermatopathol.* 28, 99-104.
- 45 Mena H, Morrison AL, Jones RV, Gyure KA (2001). Central neurocytomas express photoreceptor differentiation. *Cancer* 91, 136-143.
- Schleicher RL, Hunter SB, Zhang M, Zheng M, Tan W, Bandea CI, Fallon MT, Bostwick DG, Varma VA (1997). Neurofilament heavy chain-like messenger RNA and protein are present in benign prostate and down-regulated in prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 57, 3532-3536.
- 50 Segal A, Carello S, Caterina P, Papadimitriou JM, Spagnolo DV (1994). Gastrointestinal autonomic nerve tumors: a clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of 10 cases. *Pathology* 26, 439-447.
- Szebenyi G, Smith GM, Li P, Brady ST (2002). Overexpression of neurofilament H disrupts normal cell structure and function. *J Neurosci. Res.* 68, 185-198.
- 55 Tanaka Y, Ijiri R, Kato K, Kato Y, Misugi K, Nakatani Y, Hara M (2000). HMB-45/melan-A and smooth muscle actin-positive clear-cell epithelioid tumor arising in the ligamentum teres hepatis: additional example of clear cell 'sugar' tumors. *Am. J Surg. Pathol.* 24, 1295-1299.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

	<110> immatics biotechnologies GmbH
5	<120> Новий метод імунотерапії різних типів пухлин, таких як рак легенів, включаючи НДРЛ
	<130> I32387WO
10	<150> GB1313987.8 <151> 2013-08-05
	<150> US61/862,213 <151> 2013-08-05
15	<150> GB1403297.3 <151> 2014-02-25
	<160> 92
20	<170> PatentIn version 3.5
	<210> 1 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens
25	<400> 1
30	Ile Leu Phe Glu Ile Asn Pro Lys Leu 1 5
	<210> 2 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens
35	<400> 2
40	Lys Ile Gln Glu Met Gln His Phe Leu 1 5
	<210> 3 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens
45	<400> 3
50	Ala Leu Asp Glu Asn Leu His Gln Leu 1 5
	<210> 4 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens
55	
60	

<400> 4  
 Asn Leu Ile Glu Lys Ser Ile Tyr Leu  
 1 5  
 5  
 <210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 Thr Leu Ser Ser Ile Lys Val Glu Val  
 1 5  
 15  
 <210> 6  
 <211> 9  
 20 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 25 Lys Leu Asp Glu Thr Asn Asn Thr Leu  
 1 5  
 30  
 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7  
 35 Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Val  
 1 5  
 40  
 <210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 8  
 Ser Met Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu  
 1 5  
 50  
 <210> 9  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 9  
 Ala Leu Met Asp Lys Glu Gly Leu Thr Ala Leu  
 1 5 10  
 60

5      <210> 10  
       <211> 9  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
  
       <400> 10  
  
 10     Val Leu Ser Val Val Glu Val Thr Leu  
       1                5  
  
 15     <210> 11  
       <211> 12  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
  
       <400> 11  
  
 20     Val Leu Leu Pro Val Glu Val Ala Thr His Tyr Leu  
       1                5                10  
  
 25     <210> 12  
       <211> 9  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
  
       <400> 12  
  
 30     Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu  
       1                5  
  
 35     <210> 13  
       <211> 9  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
  
 40     <400> 13  
  
       Tyr Leu Ile His Phe Pro Val Ser Val  
       1                5  
  
 45     <210> 14  
       <211> 9  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
  
 50     <400> 14  
  
       Phe Gln Tyr Asp His Glu Ala Phe Leu  
       1                5  
  
 55     <210> 15  
       <211> 9  
       <212> PRT  
 60     <213> Homo sapiens

<400> 15

5 Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala  
1 5

<210> 16  
<211> 10  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

15 Thr Val Ile Gly Phe Leu Leu Pro Phe Ala  
1 5 10

<210> 17  
20 <211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 17

25 Arg Leu Leu Gly Pro Ser Ala Ala Ala Asp Ile Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 18  
30 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

35 Thr Leu Tyr Pro His Thr Ser Gln Val  
1 5

<210> 19  
40 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

45 Ala Val Val Glu Phe Leu Thr Ser Val  
1 5

50 <210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
55 <213> Homo sapiens

<400> 20

60 Ala Leu Val Asp His Thr Pro Tyr Leu  
1 5

5	<210> 21 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 21
10	Ala Ile Leu Asp Thr Leu Tyr Glu Val 1 5
15	<210> 22 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 22
20	Phe Leu Ile Pro Ile Tyr His Gln Val 1 5
25	<210> 23 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 23
30	Phe Leu His His Leu Glu Ile Glu Leu 1 5
35	<210> 24 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 24
40	Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val 1 5
45	<210> 25 <211> 10 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 25
50	Gly Leu Tyr Pro Asp Ala Phe Ala Pro Val 1 5 10
55	<210> 26 <211> 9 <212> PRT
60	

<213> Homo sapiens  
 <400> 26  
 5 Lys Leu Phe Gly Glu Lys Thr Tyr Leu  
 1 5  
 <210> 27  
 10 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 27  
 15 Thr Val Ala Glu Val Ile Gln Ser Val  
 1 5  
 20 <210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 28  
 Ser Ile Ser Asp Val Ile Ala Gln Val  
 1 5  
 30 <210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35 <400> 29  
 Arg Leu Glu Glu Asp Asp Gly Asp Val Ala Met  
 1 5 10  
 40 <210> 30  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens  
 <400> 30  
 Lys Ile Tyr Asn Glu Phe Ile Ser Val  
 50 1 5  
 <210> 31  
 <211> 9  
 55 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 31  
 60 Ala Ile Asp Gly Asn Asn His Glu Val



1	5	
5		<210> 32 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 32
10		Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ile Tyr Leu 1 5
15		<210> 33 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 33
20		Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val 1 5
25		<210> 34 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 34
30		Ala Leu Gly Ala Gly Ile Glu Arg Met 1 5
35		<210> 35 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 35
40		Val Leu Phe Pro Asn Leu Lys Thr Val 1 5
45		<210> 36 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 36
50		Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val 1 5
55		<210> 37 <211> 9
60		

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 37  
 5 Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu  
 1 5  
  
 10 <210> 38  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 15 <400> 38  
 Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val  
 1 5  
  
 20 <210> 39  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 39  
 Arg Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu  
 1 5  
 30  
 <210> 40  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 35 <213> Homo sapiens  
 <400> 40  
 Gly Leu Thr Asp Asn Ile His Leu Val  
 40 1 5  
  
 <210> 41  
 <211> 12  
 45 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41  
 50 Ser Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val  
 1 5 10  
  
 <210> 42  
 55 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 42  
 60

Ser Leu Trp Gly Gly Asp Val Val Leu  
1 5

5 <210> 43  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 43

Ala Leu Phe Pro His Leu Leu Gln Pro Val  
1 5 10

15 <210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 44

Asn Leu Leu Ala Glu Ile His Gly Val  
1 5

25 <210> 45  
<211> 10  
<212> PRT  
30 <213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Ile Met Gly Phe Ile Gly Phe Phe Val  
1 5 10

35 <210> 46  
<211> 9  
40 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 46

45 Thr Leu Thr Asn Ile Ile His Asn Leu  
1 5

50 <210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 47

55 Gly Val Leu Glu Asn Ile Phe Gly Val  
1 5

60 <210> 48

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 48  
 Gly Leu Ile Glu Ile Ile Ser Asn Ala  
 1 5  
 10  
 <210> 49  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 49  
 Arg Leu Leu Ala Ala Glu Asn Phe Leu  
 1 5  
 20  
 <210> 50  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 50  
 Ser Leu Leu Pro Val Asp Ile Arg Gln Tyr Leu  
 1 5 10  
 30  
 <210> 51  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 51  
 Tyr Leu Ala Pro Phe Leu Arg Asn Val  
 1 5  
 40  
 <210> 52  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <400> 52  
 50  
 Ala Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Ser Leu  
 1 5  
 55  
 <210> 53  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 60  
 <400> 53

Tyr Leu Pro His Ala Pro Pro Phe Ala  
 1 5

5

<210> 54  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 54

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

15

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

20

<400> 55

Ser Leu Ala Asp Phe Met Gln Glu Val  
 1 5

25

<210> 56  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30

<400> 56

Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val  
 1 5

35

<210> 57  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40

<400> 57

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

45

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

50

<400> 58

Ser Leu Ile Asp Ala Asp Pro Tyr Leu  
 1 5

55

60

5 <210> 59  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 59  
 Ile Leu Val Ser Trp Leu Pro Arg Leu  
 1 5  
 10  
 <210> 60  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 60  
 Val Val Asp Lys Thr Leu Leu Leu Val  
 1 5  
 20  
 <210> 61  
 <211> 9  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 61  
 30 Thr Leu Ile Ser Arg Leu Pro Ala Val  
 1 5  
 35 <210> 62  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 62  
 40 Ile Leu Phe Pro Asp Ile Ile Ala Arg Ala  
 1 5 10  
 45 <210> 63  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50 <400> 63  
 Ser Leu Ala Gly Asp Val Ala Leu Gln Gln Leu  
 1 5 10  
 55 <210> 64  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 60 <213> Homo sapiens

<400> 64  
 Ala Met Leu Ala Val Leu His Thr Val  
 1 5  
 5  
 <210> 65  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 65  
 Lys Val Leu Glu Ile Leu His Arg Val  
 1 5  
 15  
 <210> 66  
 <211> 9  
 20 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 66  
 Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val  
 1 5  
 25  
 <210> 67  
 <211> 9  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 67  
 35 Ile Leu Gln Asp Arg Leu Asn Gln Val  
 1 5  
 40 <210> 68  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 68  
 Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu  
 1 5  
 50  
 <210> 69  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 69  
 Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val  
 1 5  
 60

5	<210> 70 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 70
10	Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val 1 5
15	<210> 71 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 71
20	Lys Leu Leu Glu Tyr Ile Glu Glu Ile 1 5
25	<210> 72 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 72
30	Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala 1 5
35	<210> 73 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens
40	<400> 73  Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val 1 5
45	<210> 74 <211> 11 <212> PRT <213> Homo sapiens
50	<400> 74  Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu 1 5 10
55	<210> 75 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens
60	<210> 75 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens



<400> 75

Ala Leu Tyr Asp Ser Val Ile Leu Leu  
5 1 5

<210> 76

<211> 18

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

15 Ile Asn Asn Tyr Thr Pro Asp Met Asn Arg Glu Asp Val Asp Tyr Ala  
1 5 10 15

Ile Arg

20

<210> 77

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

30 Thr Asn Gly Val Ile His Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp  
1 5 10 15

Thr

35

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 78

Ser Leu Tyr Asp Asn Gln Ile Thr Thr Val  
45 1 5 10

<210> 79

<211> 10

50 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

55 Ser Leu Ala Pro Ala Gly Val Ile Arg Val  
1 5 10

<210> 80

60 <211> 12

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 80  
 5 Ser Leu Phe Gly Asn Ser Gly Ile Leu Glu Asn Val  
 1 5 10  
  
 10 <210> 81  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 15 <400> 81  
 Ala Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Val Val  
 1 5  
  
 20 <210> 82  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 25 <400> 82  
 Ala Leu Trp Glu Lys Asn Thr His Leu  
 1 5  
  
 30 <210> 83  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 35 <400> 83  
 Ala Leu Ala Asn Gln Lys Leu Tyr Ser Val  
 1 5 10  
  
 40 <210> 84  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 45 <400> 84  
  
 50 Ile Leu Met Gly Thr Glu Leu Thr Gln Val  
 1 5 10  
  
 55 <210> 85  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 60 <400> 85

Lys Ile Val Asp Phe Ser Tyr Ser Val  
1 5

5 <210> 86  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 86

Ala Met Ala Thr Glu Ser Ile Leu His Phe Ala  
1 5 10

15 <210> 87  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 87

Arg Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Gln Ser Val  
1 5 10

25 <210> 88  
<211> 11  
<212> PRT  
30 <213> Homo sapiens

<400> 88

Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu  
1 5 10

35 <210> 89  
<211> 9  
40 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 89

45 Ala Leu Ala Ser Val Ile Lys Glu Leu  
1 5

50 <210> 90  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 90

55 Ser Leu Val Ala Val Glu Leu Glu Lys Val  
1 5 10

60 <210> 91  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 91

5

Ala Met Phe Glu Asn Phe Val Ser Val  
1 5

10

<210> 92  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15

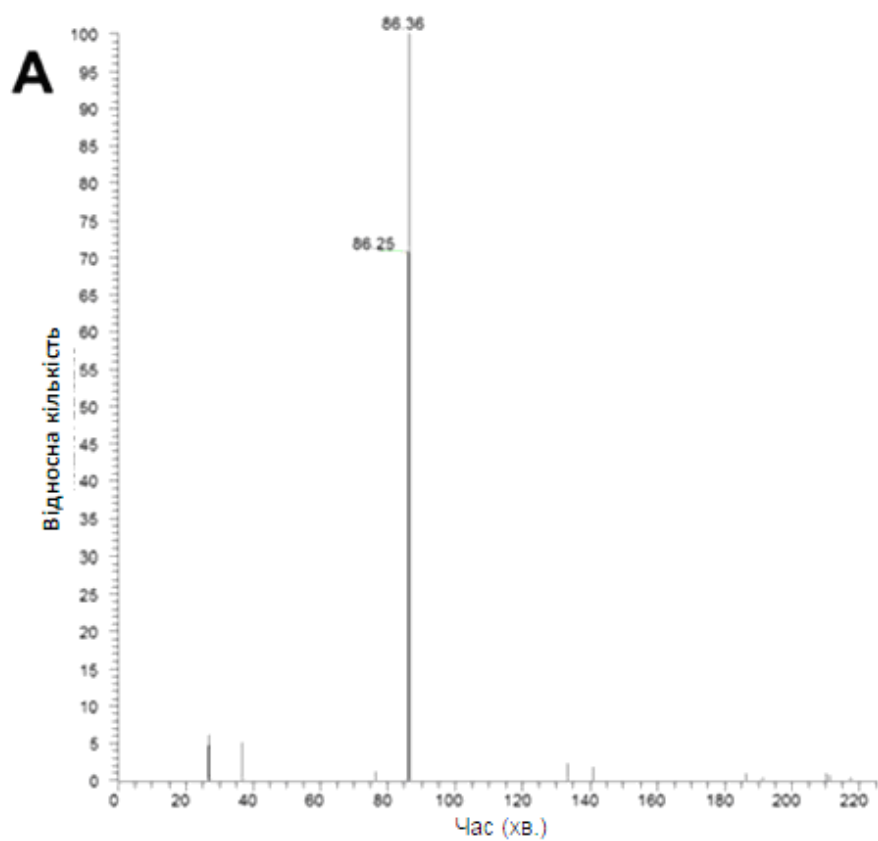
<400> 92  
  
His Leu Leu Glu Asp Ile Ala His Val  
1 5

20

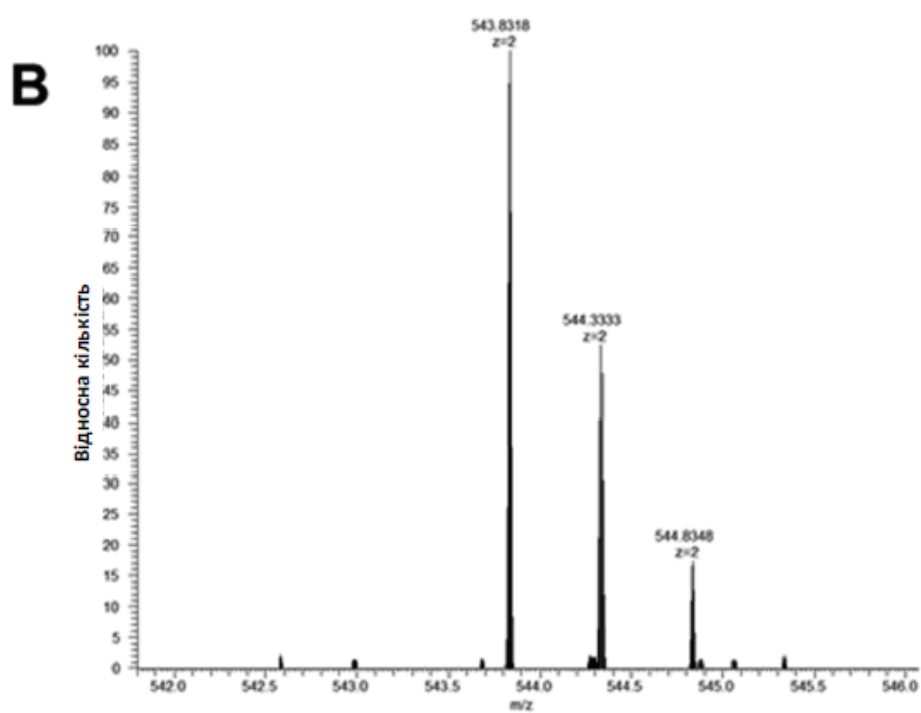
# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Пептид, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 5 або фармацевтично прийнятної солі послідовності SEQ ID NO: 5.
2. Пептид за п. 1, де згаданий пептид містить непептидні зв'язки.
- 25 3. Пептид за п. 1 або 2, де згаданий пептид є частиною злитого білка, зокрема злитого із N-кінцевими амінокислотами антигенасоційованого інваріантного ланцюга (li) HLA-DR, або злитого з антитілом.
4. Нуклеїнова кислота, що кодує пептид за будь-яким із пп. 1-3.
5. Нуклеїнова кислота за п. 4, яка є ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їхньою комбінацією.
- 30 6. Вектор експресії, здатний експресувати нуклеїнову кислоту за п. 4 або 5.
7. Пептид за будь-яким із пп. 1-3, нуклеїнова кислота за п. 4 або 5 або вектор експресії за п. 6 для застосування в медицині.
8. Клітина-хазяїн, що містить нуклеїнову кислоту за п. 4 або 5 або вектор експресії за п. 6, де згадана клітина-хазяїн не є ембріональною стовбуровою клітиною людини.
- 35 9. Клітина-хазяїн за п. 8, де згадана клітина є антигенпрезентуючою клітиною, наприклад дендритною клітиною.
10. Фармацевтична композиція, що містить пептид за будь-яким із пп. 1-3 або його фармацевтично прийнятну сіль і принаймні один інший компонент, вибраний з групи фармацевтично прийнятних, краще водних носіїв і/або допоміжних речовин, таких як буфери,
- 40 зв'язувальні агенти, розпушувачі, розріджувачі, ароматизатори, антифрикційні речовини і імуностимулюючі або імуномодулюючі речовини, такі як цитокіни, імуномодулятори, ад'юванти і терапевтичні речовини з імуномодулюючими властивостями.
11. Спосіб отримання пептиду за будь-яким із пп. 1-3, де спосіб включає культивування клітини-хазяїна за п. 8 або 9 і виділення згаданого пептиду з клітини-хазяїна або її
- 45 культурального середовища.
12. Спосіб отримання активованого цитотоксичного Т-лімфоциту (ЦТЛ) або Т-хелперної клітини (Th-клітини) *in vitro*, причому спосіб включає контактування *in vitro* ЦТЛ або Th-клітини із навантаженими антигеном молекулами МНС людини I класу, що експресуються на поверхні відповідної антигенпрезентуючої клітини, протягом періоду часу, достатнього для активації
- 50 згаданого ЦТЛ шляхом набуття ним специфічності до антигену, де згаданий антиген є пептидом за будь-яким із пп. 1-3.
13. Спосіб за п. 12, де згаданий антиген навантажують на молекули МНС I класу, що експресуються на поверхні відповідної антигенпрезентуючої клітини, шляхом контакту достатньої кількості згаданого антигену зі згаданою антигенпрезентуючою клітиною.
- 55 14. Спосіб за п. 12 або 13, де згадана антигенпрезентуюча клітина містить вектор експресії, здатний експресувати пептид за будь-яким із пп. 1-3.
15. Активованний цитотоксичний Т-лімфоцит (ЦТЛ) або Т-хелперна клітина (Th-клітина), отримані згідно зі способом за будь-яким із пп. 12-14, де згадані ЦТЛ або Th-клітина селективно розпізнають пептид за будь-яким з пп. 1-3.

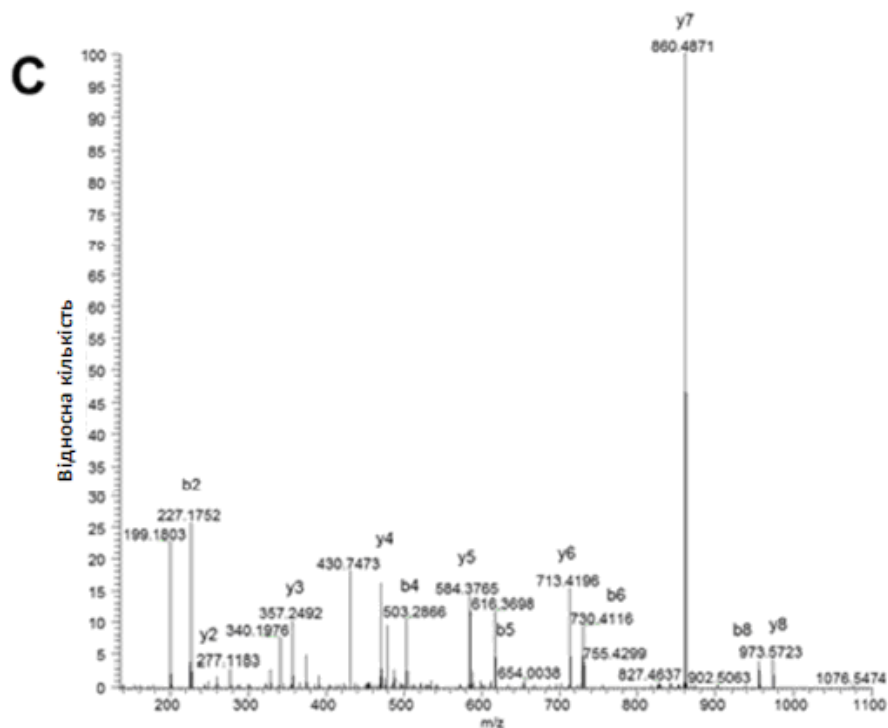
16. Спосіб отримання *in vitro* ТКР або рТКР або його фрагмента, який є специфічним до пептиду за будь-яким із пп. 1-3, де спосіб включає клонування варіабельних доменів із активованого цитотоксичного Т-лімфоциту (ЦТЛ) або Т-хелперної клітини (Th-клітини) за п. 15 і експресію згаданого ТКР або рТКР або його фрагмента у прийнятному хазяїні і/або експресійній системі.
17. Виділений зв'язувальний агент, який зв'язується і переважно специфічно зв'язується з пептидом за будь-яким із пп. 1-3 або з комплексом пептиду за будь-яким із пп. 1-3 з молекулою МНС.
18. Виділений зв'язувальний агент за п. 17, де вказаний виділений зв'язувальний агент являє собою антитіло або його фрагмент, білок, нуклеїнову кислоту, пептид, ТКР або рТКР або його фрагмент.
19. Застосування пептиду за будь-яким із пп. 1-3 як лікарського засобу, де згаданий лікарський засіб виявляє активність проти раку, вибраного з недрібноклітинного раку легень (НДРЛ), раку легень, раку шлунка і/або гліобластоми, причому краще, коли згаданий лікарський засіб являє собою вакцину.
20. Застосування нуклеїнової кислоти за п. 4 або 5 або вектора експресії, здатного експресувати нуклеїнову кислоту за п. 4 або 5, як лікарського засобу, де згаданий лікарський засіб виявляє активність проти раку, вибраного з недрібноклітинного раку легень (НДРЛ), раку легень, раку шлунка і/або гліобластоми, причому краще, коли згаданий лікарський засіб являє собою вакцину.
21. Застосування клітини за п. 8 або 9 як лікарського засобу, де згаданий лікарський засіб виявляє активність проти раку, вибраного з недрібноклітинного раку легень (НДРЛ), раку легень, раку шлунка і/або гліобластоми, причому краще, коли згаданий лікарський засіб являє собою вакцину.
22. Застосування активованого цитотоксичного Т-лімфоциту за п. 15 як лікарського засобу, де згаданий лікарський засіб виявляє активність проти раку, вибраного з недрібноклітинного раку легень (НДРЛ), раку легень, раку шлунка і/або гліобластоми, причому краще, коли згаданий лікарський засіб являє собою вакцину.
23. Застосування виділеного зв'язувального агента, такого як антитіло або ТКР, або рТКР за п. 17, як лікарського засобу, де згаданий лікарський засіб виявляє активність проти раку, вибраного з недрібноклітинного раку легень (НДРЛ), раку легень, раку шлунка і/або гліобластоми, причому краще, коли згаданий лікарський засіб являє собою вакцину.
24. Застосування за будь-яким із пп. 19-23 для адаптивної клітинної терапії у людини.
25. Фармацевтична композиція, що містить:
  - (a) елемент, вибраний із групи, що складається з:
    - (a1) виділеного пептиду за будь-яким із пп. 1-3,
    - (a2) Т-клітинного рецептора, рТКР або його фрагмента за п. 17,
    - (a3) злитого білка за п. 3,
    - (a4) нуклеїнової кислоти за п. 4 або 5,
    - (a5) вектора експресії за п. 6,
    - (a6) клітини-хазяїна за п. 8 або 9, і
    - (a7) активованого цитотоксичного Т-лімфоциту або Т-хелперної клітини за п. 15, і
  - (b) фармацевтично прийнятний носій, і необов'язково
  - (c) принаймні один інший компонент, вибраний із групи фармацевтично прийнятних допоміжних речовин, буферів, зв'язувальних агентів, розпушувачів, розріджувачів, ароматизаторів, антифрикційних речовин і імуностимулюючих або імуномодулюючих речовин, таких як цитокіни, імуномодулятори, ад'юванти і терапевтичні речовини з імуномодулюючими властивостями.



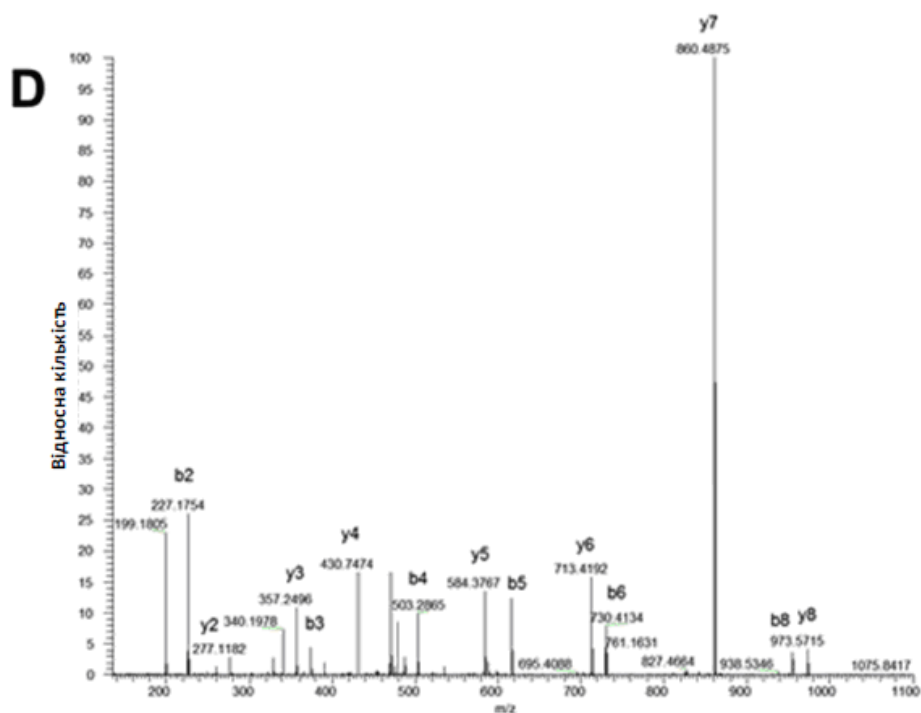
Фіг. 1



Фіг. 1 (продовження)



Фіг. 1 (продовження)



Фіг. 1 (продовження)

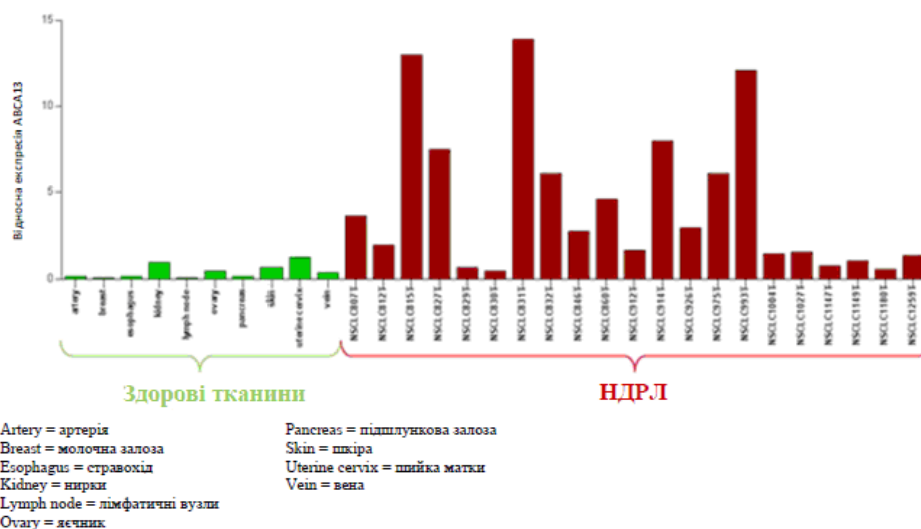


Fig. 2a

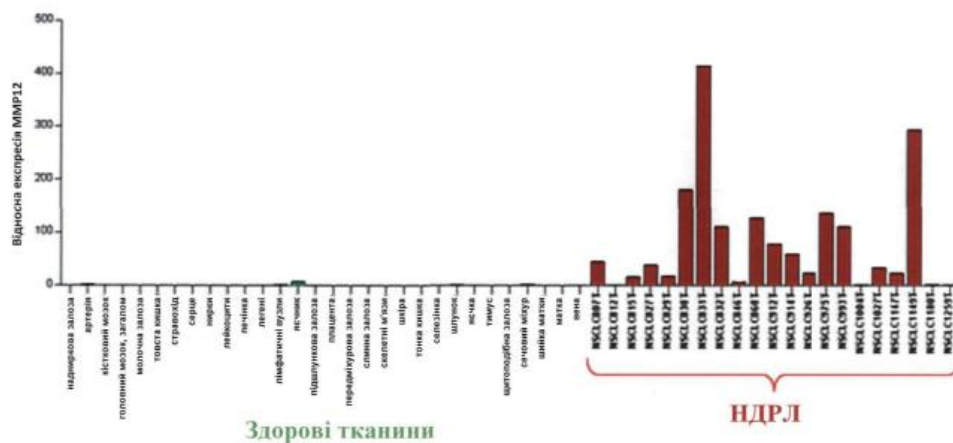


Fig. 2b

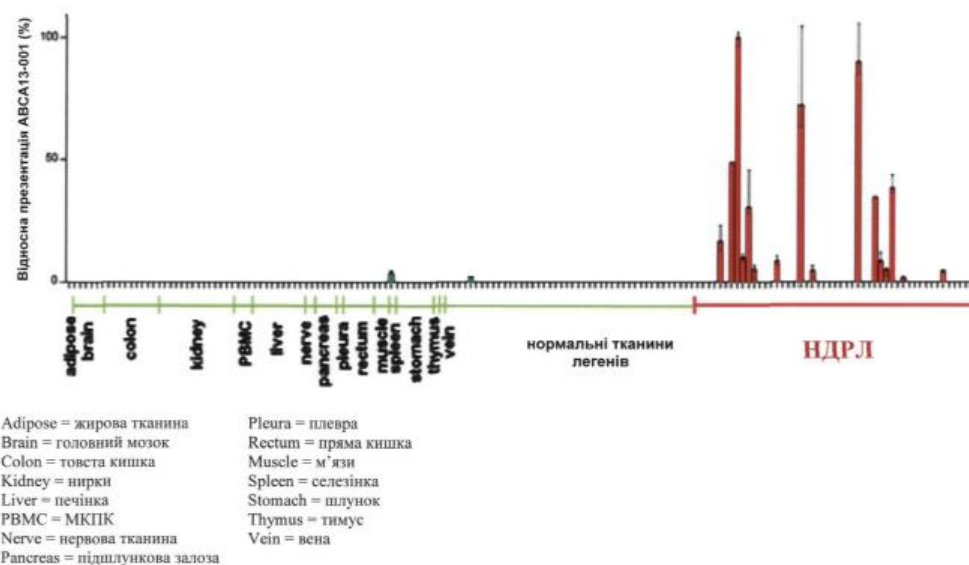
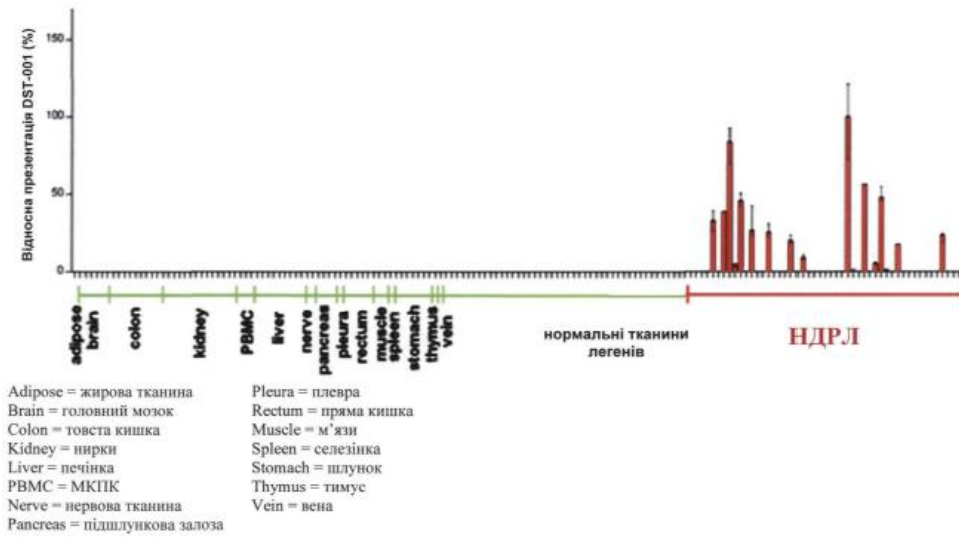
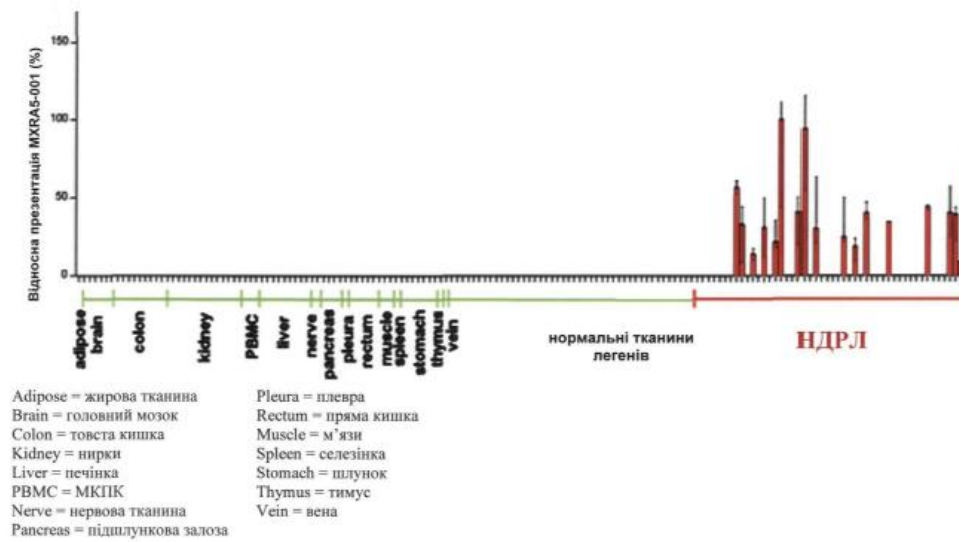


Fig. 3a

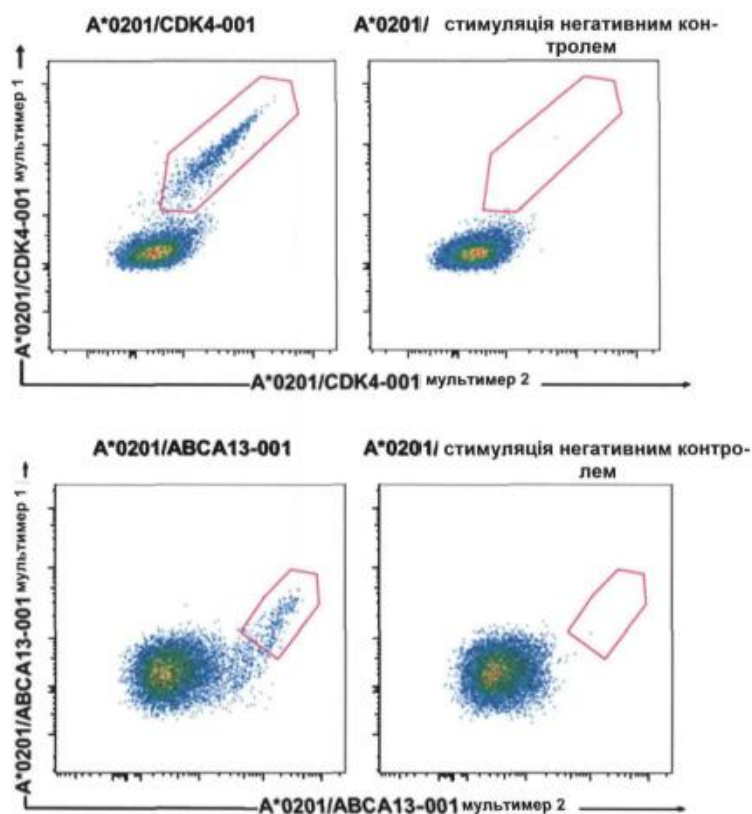




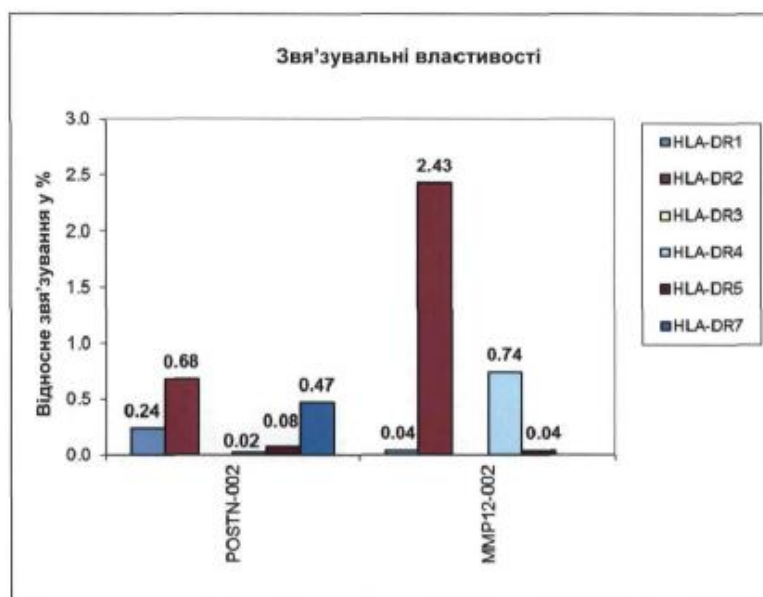
Фіг. 3b



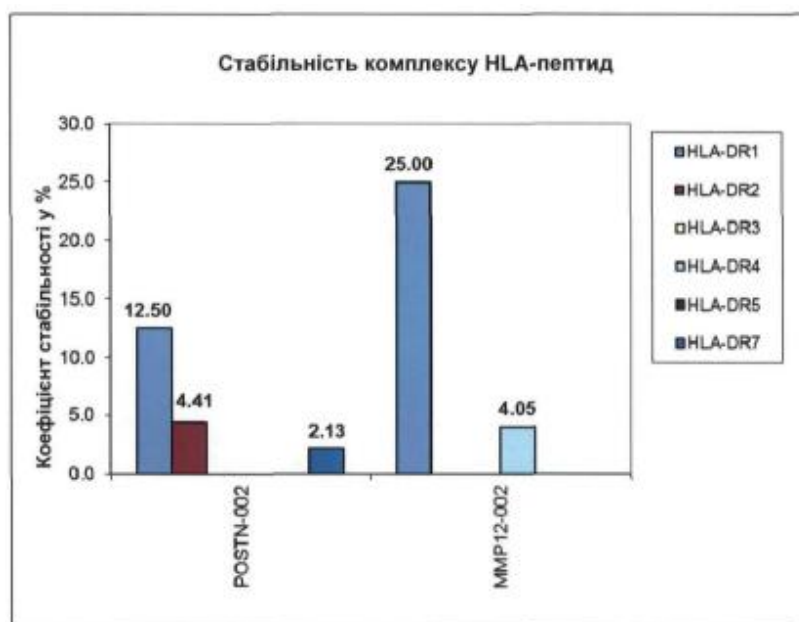
Фіг. 3c



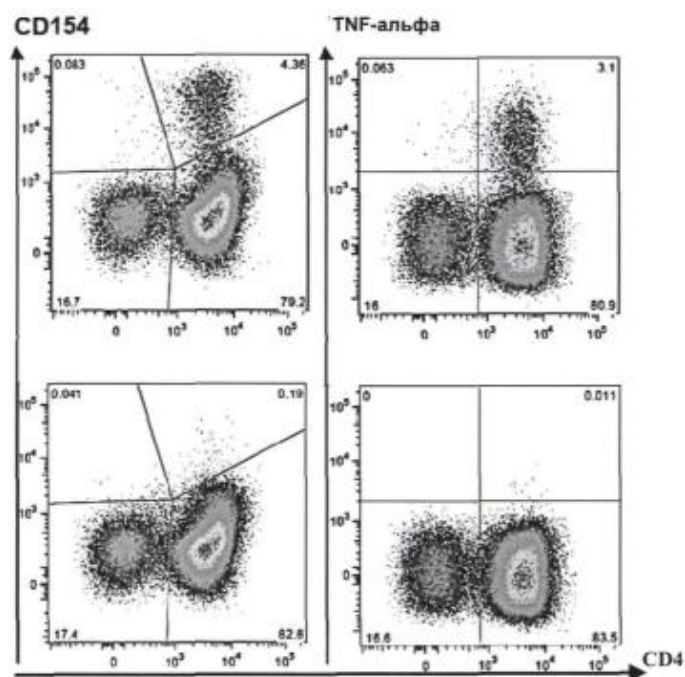
Фіг. 4



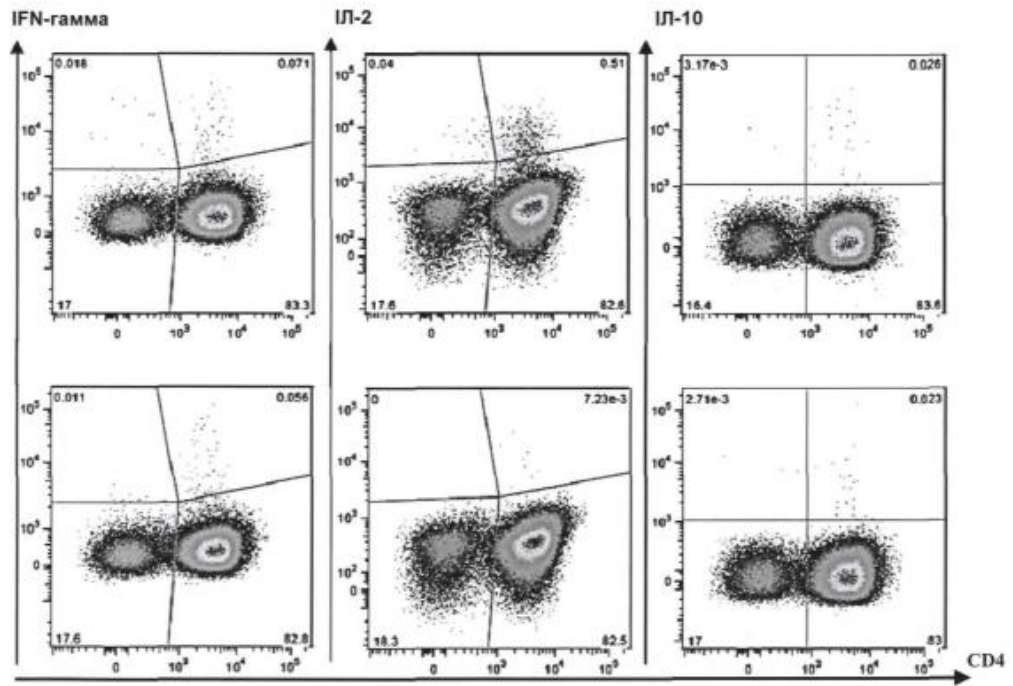
Фіг. 5



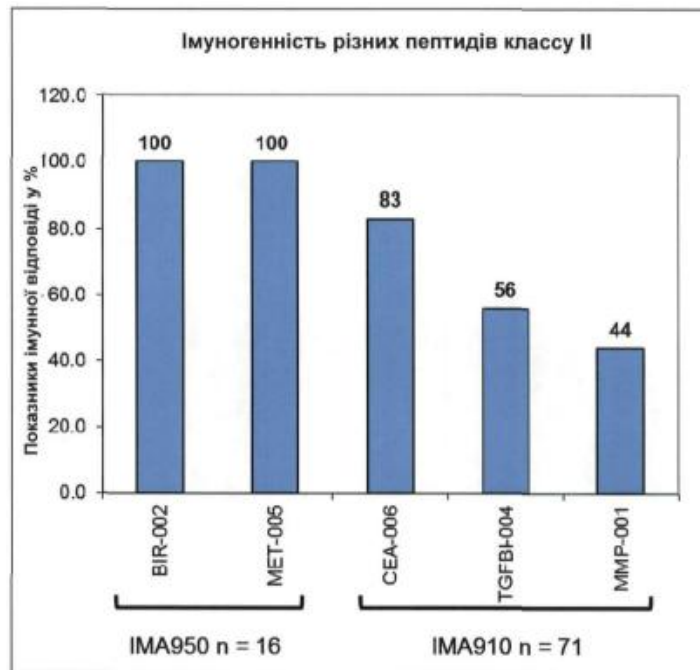
Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 7 (продовження)



Фіг. 8