

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090821** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.12.30

(22) Дата подачи заявки
2014.08.04

(51) Int. Cl. *A61K 38/04* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) **НОВЫЙ МЕТОД ИММУНОТЕРАПИИ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ОПУХОЛЕЙ, ТАКИХ КАК РАК ЛЕГКОГО, ВКЛЮЧАЯ НМРЛ**

(31) 1313987.8; 61/862,213; 1403297.3

(32) 2013.08.05; 2013.08.05; 2014.02.25

(33) GB; US; GB

(62) 201690016; 2014.08.04

(71) Заявитель:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Вайншенк Тони, Вальтер Штеффен,
Фрицше Дженс, Сонг Колетт, Сингх
Харпреет (DE)**

(74) Представитель:
**Глухарёва А.О., Гизатуллин Ш.Ф.,
Угрюмов В.М. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к пептидам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится далее к опухолиассоциированным цитотоксическим пептидным эпитопам Т-клеток (ЦТЛ), в отдельности или в комбинации с другими опухолиассоциированными пептидами, которые служат в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, стимулирующих противоопухолевые иммунные ответы. Настоящее изобретение относится к более чем 70 новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA класса I и HLA класса II человеческих опухолевых клеток, которые могут быть использованы в вакцинных композициях для вызывания противоопухолевых иммунных ответов.

А1
202090821

202090821
А1

НОВЫЙ МЕТОД ИММУНОТЕРАПИИ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ОПУХОЛЕЙ, ТАКИХ КАК РАК ЛЕГКОГО, ВКЛЮЧАЯ НМРЛ

Настоящее изобретение относится к пептидам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится далее к опухолеассоциированным цитотоксическим пептидным эпитопам Т-клеток (ЦТЛ), в отдельности или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, которые служат в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, стимулирующих противоопухолевые иммунные ответы. Настоящее изобретение относится к 67 новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA класса I и HLA класса II человеческих опухолевых клеток, которые могут быть использованы в вакцинных композициях для вызывания противоопухолевых иммунных ответов.

Уровень техники

Рак легкого является наиболее частой причиной смертности от рака как среди мужчин, так и среди женщин. Рак легкого представляет собой наиболее распространенный вид рака в мире, как по частоте возникновения, так и по уровню смертности. На 2008 год приходится 1,61 миллиона новых случаев и 1,38 миллиона смертей в связи с раком легкого. Наиболее высокие показатели зафиксированы в Европе и Северной Америке.

Начиная с 1987 года, от рака легких ежегодно умирало больше женщин, чем от рака молочной железы. Число смертей среди мужчин значительно снижалось в период с 1991 по 2003 гг., примерно на 1,9% ежегодно. Смертность от рака легких среди женщин сохраняется на неизменном уровне после продолжительного роста на протяжении нескольких десятилетий. Данные тенденции по смертности от рака легких отражают снижение числа курящих на протяжении последних 30 лет.

Согласно данным Национального института рака (National cancer institute, NCI) в 2013 г. в США было зарегистрировано приблизительно 230.000 новых случаев заболевания раком легкого и 160.000 смертельных исходов от него.

В целях лечения рак легкого клинически классифицируется на мелкоклеточный (13%, МРЛ) и немелкоклеточный (87%, НМРЛ). Прогноз при этом обычно неутешителен. Из всех пациентов

после постановки диагноза рака легкого в течение 5 лет выживает 15%. Диагноз ставится зачастую уже во время поздней стадии заболевания. На момент обнаружения IV стадия заболевания наблюдается в 30–40% всех случаев НМРЛ и 60% МРЛ.

Вид лечения определяется типом (мелкоклеточный или немелкоклеточный) и стадией ракового заболевания и включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, а также биологическую направленную (таргетную) терапию, такими препаратами как бевацизумаб (AVASTIN®) и эрлотиниб (TARCEVA®). Для локализованного вида рака в качестве терапии обычно выбирается операция. Последние исследования указывают на то, что выживаемость при немелкоклеточном раке легких ранней стадии улучшается, если за операцией следует химиотерапия. Так как на момент своего обнаружения заболевание обычно уже распространено, часто используются лучевая терапия и химиотерапия, иногда в сочетании с операцией. Химиотерапия в отдельности или в сочетании с лучевой терапией является стандартным лечением, выбираемым для мелкоклеточного рака легких; при данной схеме лечения большой процент пациентов испытывает ремиссию, которая в некоторых случаях бывает продолжительной.

Одногодичная относительная выживаемость для пациентов, больных раком легких, слегка возросла с 37% в 1975-1979 гг. до 42% в 2002 году, во многом благодаря усовершенствованиям в хирургической технике и комбинированным способам лечения. Однако 5-летний срок выживаемости для всех стадий в целом составил лишь 16%. Процент выживаемости для всех случаев, обнаруживаемых, когда заболевание все еще локализовано, составляет 49%; однако только 16% всех случаев рака легких диагностируются на этой ранней стадии.

Несмотря на описанное выше до сих пор существует потребность в новом, эффективном и безопасном способе лечения для таких видов рака, как рак легкого, в частности немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака желудка и опухолевых заболеваний мозга различных фенотипов, которые улучшали бы самочувствие пациентов без чрезмерного применения химиотерапевтических средств или других веществ, которые могут вызывать тяжелые побочные эффекты.

В настоящем изобретении использованы пептиды, которые стимулируют иммунную систему пациента и выполняют функцию противоопухолевых препаратов неинвазивного способа воздействия.

Краткое изложение сущности изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и с SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92, или его вариант, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и с SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92, где указанный вариант индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемая соль, где указанный пептид не является полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбирается из группы с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и с SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92 или их варианта, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину в случае последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и с SEQ ID NO 78 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92, составляющую 8 – 100, предпочтительно 8 – 30 и, наиболее предпочтительно, 8 – 14 аминокислот, и в случае SEQ ID NO 76 и 77, составляющую 12 – 100, предпочтительно 12 – 30, и, наиболее предпочтительно, 12 – 18 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO; и потенциальные исходные белки для данных пептидов. Все пептиды, представленные в Таблицах 1a, 1b и 1c, связываются с аллелем HLA A*02, пептиды из Таблицы 1d связываются с аллелями HLA-DR. Пептиды в Таблице 1c пригодны, кроме того, для постановки диагноза и/или лечения рака желудка и/или глиобластомы.

Пептиды II класса в Таблице 1d пригодны, кроме того, для постановки диагноза и/или лечения рака желудка и других видов раковых заболеваний, при которых избыточно экспрессируются или презентуются MMP12 или POSTN.

Таким образом, настоящее изобретение относится, в частности, к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность в соответствии с SEQ ID NO 76 или его варианту, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичен) SEQ ID NO 76, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 12 – 100, предпочтительно 12 – 30 и, наиболее предпочтительно, 12 – 18 аминокислот. Настоящее изобретение относится в частности к пептиду по настоящему изобретению, состоящему из последовательности в соответствии с SEQ ID NO 76.

Настоящее изобретение относится также в частности к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность в соответствии с SEQ ID NO 77 или его варианту, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичен) SEQ ID NO 77, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 12 – 100, предпочтительно 12 – 30 и, наиболее предпочтительно, 12 – 18 аминокислот. Настоящее изобретение относится в частности к пептиду по настоящему изобретению, состоящему из последовательности в соответствии с SEQ ID NO 77.

Таблица 1а: Пептиды настоящего изобретения

SEQ ID NO:	Код пептида	Последовательность	Исходный(е) белок (белки)
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	KLDETNTL	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	KLAVALLAA	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	AILDTLYEV	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
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	TLVAIVVGV	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	TLTNIHNL	ORMDL1
47	PCNXL3-001	GVLENIFGV	PCNXL3
48	SNRNP20-001	GLIEIISNA	SNRNP200

Таблица 1b: Дополнительные пептиды настоящего изобретения

SEQ ID NO:	Код пептида	Последовательность	Исходный(е) белок (белки)
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	VVDKTLVV	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

Таблица 1с: Дополнительные пептиды, которые также в избытке экспрессируются клетками глиобластомы и/или рака желудка

SEQ ID NO:	Код пептида	Последовательность	Исходный(е) белок (белки)
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

Таблица 1d: Пептиды по изобретению МНС II класса

SEQ ID NO:	Код пептида	Последовательность	Исходный(е) белок (белки)
76	MMP12-002	INNYTPDMNREDVDYAIR	MMP12
77	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	POSTN

Таблица 1е: Другие предпочтительные пептиды по настоящему изобретению, представленные в избытке также в других вида рака

SEQ ID NO:	Код пептида	Последовательность	Исходный(е) белок (белки)
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

Таблица 1f: Другие пептиды по настоящему изобретению, представленные в избытке также в других вида рака

SEQ ID NO:	Код пептида	Последовательность	Исходный(е) белок (белки)
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

Настоящее изобретение, более того, относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, имеющим способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанные пептиды состоят или состоят, по существу, из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и с SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности слитого с N-терминальными аминокислотами HLA-DR антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii), или слитого с антителом (или встроенный в последовательность), таким как, например, антителом, специфичным к дендритным клеткам.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептиды в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением, которая является ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями.

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному экспрессировать нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине.

Настоящее изобретение далее относится к антителам в соответствии с настоящим изобретением и способам их получения.

Настоящее изобретение далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), в частности к растворимым ТКР, в соответствии с настоящим изобретением и способам их получения.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину, включающей нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением или вектор экспрессии, описанный ранее.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину в соответствии с настоящим изобретением, которая является антиген-презентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину в соответствии с настоящим изобретением, где антиген-презентирующая клетка является дендритной клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения пептида в соответствии с настоящим изобретением, причем способ включает культивацию клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением и выделение пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) *in vitro*, причем способ включает контактирование ЦТЛ *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами человеческого МНС I или II класса, экспрессирован-

ными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом указанных ЦТЛ, где указанный антиген является любым пептидом в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антиген нагружен на молекулы МНС I или II класса, экспрессированные на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки при контактировании достаточного количества антигена с антигенпрезентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 92, предпочтительно содержащий последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92 или указанный вариант аминокислотной последовательности.

Настоящее изобретение далее относится к активированным цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ), полученным способом в соответствии с настоящим изобретением, которые селективно распознают клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением, причем способ включает введение пациенту эффективного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к применению любого описанного пептида, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, клетки в соответствии с настоящим изобретением или активированного цитотоксического Т-лимфоцита в соответствии с настоящим изобретением в качестве лекарственного средства или в производстве лекарственного средства.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с настоящим изобретением, где лекарственное средство является вакциной.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с настоящим изобретением, где лекарственное средство проявляет противораковую активность.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками рака легкого, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы или клетками рака почек и глиобластомы.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза для рака легких, желудка, желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы или рака почек и глиобластомы.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению этих новых мишеней для лечения рака.

Стимуляция иммунных ответов зависит от присутствия антигенов, распознающихся иммунной системой хозяина как чужеродные. Открытие существования опухолеассоциированных антигенов повысило возможность использования иммунной системы хозяина для вмешательства в рост опухоли. Различные механизмы управления обеими ветвями иммунной системы, как гуморальной, так и клеточной, исследуются в настоящее время для иммунотерапии рака.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС) с пептидами, состоящими обычно из 8-10 аминокислотных

остатков, образованных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоли, играют важную роль в этом ответе. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Существуют два класса молекул МНС: молекулы МНС I класса, встречающиеся на большинстве клеток, имеющих ядро. Молекулы МНС состоят из альфа-тяжелой цепи и бета-2-микροглобулина (рецепторы МНС класса I) или альфа- и бета-цепи (рецепторы МНС класса II), соответственно. Их трехмерная форма образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами. МНС класса I презентируют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, DRIP и более крупных пептидов. Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК в период эндоцитоза и впоследствии процессируются. Комплексы из пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными цитотоксическими Т-лимфоцитами, несущими подходящий ТКР (Т-клеточный рецептор), тогда как комплексы из пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Хорошо известно, что ТКР, пептид и МНС встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

CD4-положительные хелперные Т-клетки играют важную роль в индуцировании и поддержании эффективных ответов CD8-положительных цитотоксических Т-клеток. Идентификация CD4-положительных Т-клеточных эпитопов, образованных из опухолеассоциированных антигенов (ТАА), может быть чрезвычайно важна для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов (Kobayashi et al., 2002; Qin et al., 2003; Gnjatic et al., 2003). В области опухоли Т-хелперные клетки поддерживают благоприятное для ЦТЛ цитокиновое окружение (Mortara et al., 2006) и привлекают эффекторные клетки, к примеру, ЦТЛ, естественные киллерные клетки (NK), макрофаги, гранулоциты (Hwang et al., 2007).

При отсутствии воспаления экспрессия молекул МНС II класса преимущественно ограничена клетками иммунной системы, в особенности профессиональным антигенпрезентирующим

клетками (АПК), например, моноцитами, образованными из моноцитов клетками, макрофагами, дендритными клетками. Неожиданно было обнаружено, что опухолевые клетки раковых пациентов экспрессируют молекулы МНС класса II (Dengjel et al., 2006).

На моделях млекопитающих животных, например, мышах, было показано, что даже при отсутствии эффекторных клеток (т.е. CD8-положительных Т-лимфоцитов), CD4-положительных Т-клеток достаточно для ингибирования ослабления клинических проявлений опухолей посредством ингибирования ангиогенеза при секреции интерферон-гамма (IFN γ).

К тому же было показано, что CD4-положительные Т-клетки, распознающие пептиды из опухолеассоциированных антигенов, презентированные молекулами HLA класса II, могут препятствовать опухолевой прогрессии посредством индукции ответов антител (Ab).

В отличие от опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA I класса, до сих пор было описано лишь небольшое число лигандов класса II опухолеассоциированных антигенов (ТАА).

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена клетками иммунной системы, то выделение пептидов II класса непосредственно из первичных опухолей считалось невозможным. Тем не менее, Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1; (Dengjel et al., 2006).

Антигены, которые распознаются опухолевыми специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и, по сравнению с не измененными клетками того же происхождения, находятся в повышенном количестве в клетках соответствующей опухоли.

Так как оба вида ответов, зависящие от CD8 и от CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и усиливая друг друга, то идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых как CD8⁺ ЦТЛ (лиганд: молекула МНС I класса + пептидный эпитоп), так и CD4-положительными хелперными Т-клетками (лиганд: молекула МНС II класса + пептидный эпитоп) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин.

Настоящее изобретение также относится к двум новым и очень полезным пептидам МНС II класса (содержащим последовательности в соответствии с SEQ ID NO 76 и 77). Данные пептиды особенно пригодны для постановки диагноза и/или лечения рака желудка, НМРЛ и других видов рака, клетки которых в избытке экспрессируют и/или презентуют MMP12 и POSTN, соответственно.

Настоящее изобретение также относится к так называемым "вариантам по длине" пептидов МНС II класса по изобретению в соответствии с SEQ ID NO 76 и 77. Как было упомянуто ранее, пептид в соответствии с SEQ ID NO 76 состоит из аминокислотной последовательности INNYTPDMNREDVDYAIR (MMP12-пептид), а пептид в соответствии с SEQ ID NO 77 состоит из аминокислотной последовательности TNGVIHVVDKLLYPADT (POSTN-002-пептид). Варианты по длине, как правило, являются пептидами с удлинениями на N- и/или C-конце (от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 10 аминокислотных остатков), или укорочениями на N- и/или C-конце (от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 10 аминокислотных остатков), которые все еще могут связываться с МНС и вызывать клеточный иммунный ответ в соответствии с настоящим описанием. Как известно из уровня техники, пептиды, связывающиеся с белками II класса, не ограничены по размеру и могут варьироваться по длине от 11 до 30 аминокислот. Связывающая бороздка молекул МНС II класса для пептидов открыта с обоих концов, что позволяет связываться с пептидами относительно большей длины. Хотя центральный «срединный» сегмент из девяти остатков в наибольшей степени способствует распознаванию пептида, примыкающие участки также важны для специфичности пептида относительно аллеля II класса (см., например, 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). Используя как можно больше имеющихся инструментов программного обеспечения (например, как описываемые выше), специалист данной области будет способен идентифицировать связывающий мотив и, таким образом, определить возможности для удлинения цепи и/или укорочений пептидов МНС II класса, содержащих последовательности с SEQ ID NO 76 или 77 в целях получения вариантов по длине.

Для того чтобы пептид инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он должен связываться с молекулой МНС. Этот процесс зависит от аллеля молекулы МНС и специфических полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающиеся с МНС I класса, как правило, имеют 8-12 аминокислотных остатков в длину и обычно содержат

два консервативных остатка («якори») в их последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы МНС. Таким образом, каждый аллель МНС имеет «связывающий мотив», определяющий, какие пептиды могут специфически связываться со связывающей бороздкой.

В зависящей от МНС I класса иммунной реакции пептиды не только должны быть в состоянии связываться с конкретными молекулами МНС I класса, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но они также должны распознаваться Т-клетками, несущими специфические Т-клеточные рецепторы (ТКР).

Антигены, которые распознаются опухолевыми специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и, по сравнению с не измененными клетками того же происхождения, находятся в повышенном количестве в клетках соответствующей опухоли.

Современная классификация опухолеассоциированных антигенов включает следующие основные группы:

а) Раково-тестикулярные антигены: первые в истории идентифицированные ТАА, которые могут распознаваться Т-клетками, принадлежат к этому классу, называвшемуся первоначально «раково-тестикулярные антигены» (СТ), так как его члены экспрессируются в отличных по гистологической структуре опухолях человека, а среди нормальных тканей – только в сперматозоидах/сперматогониях семенника и, изредка, в плаценте. Так как клетки семенника не экспрессируют молекулы HLA I и II класса, то эти антигены не могут быть распознаны Т-клетками в нормальных тканях и, поэтому, могут рассматриваться как иммунологически опухолеспецифические. Хорошо известными примерами антигенов СТ являются члены семейства MAGE или NY-ESO-1.

б) Антигены дифференциации: данные ТАА встречаются в опухолевых и нормальных тканях, из которых образуется опухоль; большинство из них обнаружено в меланомах и нормальных меланоцитах. Многие из этих линиеспецифических белков меланоцитов участвуют в биосинтезе меланина и, поэтому, не являются опухолеспецифическими, однако, несмотря на это, они широко применяются в противораковой терапии. Примеры включают, но не ограничиваются, тирозиназой и Melan-A/MART-1 для меланомы или PSA для рака предстательной железы.

с) Экспрессированные в избытке ТАА: гены, кодирующие широко экспрессированные ТАА, были обнаружены в различных по гистологической структуре опухолях, а также во многих нормальных тканях, в основном, с более низким уровнем экспрессии. Возможно, что многие эпитопы, процессируемые и потенциально презентруемые нормальными тканями, находятся ниже порогового уровня для распознавания Т-клетками, в то время как их избыточная экспрессия в опухолевых клетках может инициировать противораковый ответ, нарушая установившуюся ранее толерантность. Известными примерами ТАА этого класса являются Her-2/neu, сурвивин, теломераза или WT1.

д) Опухолеспецифические антигены: данные уникальные ТАА образуются в результате мутаций нормальных генов (таких как β -катенин, CDK4 и т.д.). Некоторые из этих молекулярных изменений ассоциированы с неопластической трансформацией и/или прогрессией. Опухолеспецифические антигены, в основном, способны индуцировать сильные иммунные ответы, не заключая в себе риска аутоиммунных реакций по отношению к нормальным тканям. С другой стороны, данные ТАА в большинстве случаев релевантны только для определенной опухоли, на которой они были идентифицированы, и обычно не являются общими для многих отдельных опухолей.

е) ТАА, образующиеся в результате аномальных пост-трансляционных модификаций: такие ТАА могут образоваться из белков, которые не являются ни специфическими, ни избыточно экспрессируемыми в опухолях, однако, несмотря на это, становятся опухолеассоциированными в ходе пост-трансляционных процессов, происходящих преимущественно в опухолях. Примеры для этого класса возникают в результате изменения характера гликозилирования, приводящему к появлению новых эпитопов в опухолях, как в случае MUC1, или при таких событиях как белковый сплайсинг во время деградации, который может или может не быть опухолеспецифическим.

ф) Онковирусные белки: данные ТАА являются вирусными белками и могут играть ведущую роль в онкогенном процессе, и, так как они являются чужеродными (не человеческого происхождения), они могут провоцировать Т-клеточный ответ. Примерами таких белков являются вирусные белки человеческой папилломы типа 16, Е6 и Е7, которые экспрессированы в карциноме шейки матки.

Для того чтобы белки были распознаны цитотоксическими Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифического или –ассоциированного антигена, и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрес-

сироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями; или в другом предпочтительном варианте осуществления пептид должен избыточно презентироваться опухолевыми клетками по сравнению с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т.е. число копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени белков, напрямую являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, быть косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja et al., 2004). В обоих случаях необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, поскольку такой пептид («иммуногенный пептид»), который образован из опухолеассоциированного антигена, должен вести *in vitro* или *in vivo* к Т-клеточному ответу.

В сущности, любой пептид, способный связываться с молекулой МНС может выполнять функцию Т-клеточного эпитопа. Предварительным условием для индукции Т-клеточного ответа *in vitro* или *in vivo* является присутствие Т-клетки с соответствующим ТКР и отсутствие иммунологической толерантности к данному конкретному эпитопу.

Поэтому опухолеассоциированные антигены (ТАА) являются отправным пунктом для разработки противораковой вакцины. Методы идентификации и характеристики ТАА основаны на использовании ЦТЛ, которые могут быть выделены из крови пациентов или здоровых субъектов, или же они могут быть основаны на генерировании различающихся транскрипционных профилей или различающихся паттернов экспрессии пептидов между опухолевыми и нормальными тканями.

Однако идентификация генов, избыточно экспрессированных в опухолевых тканях или человеческих опухолевых клеточных линиях или же селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не дает точной информации об использовании антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Это обусловлено тем, что только отдельная суб-

популяция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому в наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения важно выбрать только те пептиды, презентруемые в избытке или селективно, против которых может быть обнаружена функциональная и/или пролиферирующая Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена посредством клонирования и способна к выполнению эффекторных функций («эффекторная Т-клетка»).

В случае ТКР и антител в соответствии с изобретением иммуногенность базовых пептидов является второстепенной. Для ТКР и антител в соответствии с изобретением определяющим фактором является презентация.

Т-хелперные клетки играют важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы Т-хелперных клеток, инициирующие ответы Т-хелперных клеток типа T_H1 , поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих опухолеассоциированные пептиды/МНС-комплексы на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

Способы применения против других видов рака раскрыты в последующем описании белков или пептидов в соответствии с изобретением.

АТФ-связывающая кассета, член 13 (ABCA13) подсемейства А (ABC1)

У человека семейство АТФ-связывающих кассетных (ABC) трансмембранных транспортеров имеет по меньшей мере 48 генов и 7 подсемейств генов. Предсказанный белок ABCA13 состоит из 5058 аминокислотных остатков, что делает его наиболее крупным белком ABC, описанным до сих пор (Prades et al., 2002). Knight и соавторы определили, что белок ABCA13 экспрессируется у мышей и человека в гиппокампе и корковом веществе, обоих участках головного мозга, имеющих отношение к шизофрении и биполярным расстройствам (Knight et

al., 2009). Ген ABCA13 картируется на хромосоме 7p12.3, участке, ответственном за наследственное нарушение, поражающее поджелудочную железу (синдром Швахмана-Даймонда), а также являющемся локусом, задействованным в инвазии Т-клеток в опухоли и развитии метастазов (INM7), являясь поэтому позиционным геном-кандидатом для данных патологий (Prades et al., 2002).

Матричная металлопротеиназа 12 (макрофаговая эластаза) (ММР12)

ММР12, известная также как человеческая металлоэластаза (HME) или макрофаговая металлоэластаза (MME), является цинк-зависимой эндопептидазой, обладающей способностью расщеплять эластин. Помимо этого, у нее имеется широкий спектр субстратов, распространяющийся на другие матричные белки, такие как коллагены, фибронектин, ламинин, протеогликаны и нематричные белки, такие как альфа-1-антитрипсин. При астме, эмфиземе и хроническом обструктивном заболевании легких (ХОБЛ) ММР12 может приводить к разрушению альвеолярной ткани и ремоделированию тканей дыхательных путей (Cataldo et al., 2003; Wallace et al., 2008). ММР12 участвует в миграции макрофагов и, поскольку с его участием из плазминогена может образовываться ангиостатин, он задействован в ингибировании ангиогенеза (Chakraborti et al., 2003; Chandler et al., 1996; Sang, 1998). Как и другие металлопротеиназы, ММР12 задействована в таких физиологических процессах как эмбриогенез, заживление ран и менструационный цикл (Chakraborti et al., 2003; Labied et al., 2009), но и также в патологических процессах деструкции тканей.

Хотя данные основаны на небольшом количестве пациентов и случаев, в литературе представлены вполне достаточные доказательства того, что ММР12 часто экспрессируется в избытке раковыми клетками (Denys et al., 2004; Hagemann et al., 2001; Ma et al., 2009; Vazquez-Ortiz et al., 2005; Ye et al., 2008). Тем не менее, данные противоречивы в отношении влияния избыточной экспрессии ММР12 на клинические параметры и прогноз. Наряду с тем, что она может быть задействована в растворении матрикса, и таким образом, возникновении метастазов, она также может ингибировать рост опухоли посредством выработки ангиостатина, который отрицательно воздействует на ангиогенез (Gorrin-Rivas et al., 2000; Gorrin Rivas et al., 1998; Kim et al., 2004).

В случае рака легких последствия экспрессии ММР12 носят противоречивый характер. Об избыточной экспрессии ММР12 в эпителиальных клетках сообщалось при ремоделировании ткани легких, вызванном воспалением. Повышенный уровень ММР12 может играть роль при

переходе эмфиземы в рак легких (Qu et al., 2009). Исследования на животных позволяют предположить, что экспрессия MMP12 стромой или макрофагами подавляет рост опухолей легких (Acuff et al., 2006; Houghton et al., 2006). Тем не менее, имеются сообщения о том, что избыточная экспрессия MMP12 при опухолевых заболеваниях легких коррелирует с рецидивами, метастатической болезнью и более коротким периодом безрецидивной выживаемости после резекции (Cho et al., 2004; Hofmann et al., 2005).

Дистонин (DST)

DST (BPAG1-е) кодирует члена семейства белков плакинов, адгезивных белков, участвующих в формировании бляшек сцепления. BPAG1-е экспрессируется в эпителиальной ткани, обеспечивая закоривание промежуточных филаментов, содержащих кератин, на полудесмосомах (HD). Полудесмосомы представляют собой мультибелковые комплексы адгезии, поддерживающие эпителиально-стромальное соединение в стратифицированном и других сложных эпителиях. Модуляция их функции имеет решающее значение для различных биологических процессов, таких как дифференциация и миграция кератиноцитов во время заживления ран и инвазии карциномы, при которых клетки отделяются от субстрата и приобретают фенотип мигрирующих клеток (Litjens et al., 2006).

Злокачественная меланома является одним из наиболее агрессивных видов опухолей. BPAG1 экспрессируется в клеточных линиях меланомы человека (A375 и G361) и нормальных человеческих меланоцитах. Уровни аутоантител к BPAG1 в сыворотке пациентов, больных меланомой, были значимо выше, чем в сыворотке здоровых добровольцев ($p < 0,01$). Аутоантитела к BPAG1 могут быть многообещающим маркером для постановки диагноза меланомы (Shimbo et al., 2010). DST был ассоциирован с инвазией рака молочной железы (Schuetz et al., 2006). Ген BPAG1, скорее всего, участвует в процессах пролиферации, апоптоза, инвазии и метастазирования при назофарингеальной карциноме NPC (Fang et al., 2005).

Фактор ремоделирования матрикса 5 (MXRA5)

MXRA5, известный также как адликан, кодирует протеогликан, влияющий на адгезию, и относится к группе генов, задействованных в ремоделировании внеклеточного матрикса (ECM) и межклеточной адгезии (Rodningen et al., 2008). Хотя и функция белка MXRA5 при раке неизвестна, в пробах опухолей, поразивших различные ткани, такие как кожа, головной мозг, легкие и яичник, были выявлены соматические мутации MXRA5. ПЦР с обратной транскрип-

цией, проведенная для адликана (MXRA5), подтвердила результаты анализа на основе микрочипов, свидетельствующие об избыточной экспрессии при раковых заболеваниях толстой кишки в сравнении с нормальной тканью толстого кишечника (13 колоректальных опухолей и 13 нормальных тканей) (Zou et al., 2002). В недавнем исследовании белок 5, ассоциированный с ремоделированием матрикса, был вторым по частоте мутированным геном при НМРЛ (первым является TP53) (Xiong et al., 2012).

Циклин-зависимая киназа 4 (CDK4) / циклин-зависимая киназа 6 (CDK6)

CDK4 является членом семейства серин-треониновых протеинкиназ. Она является субъединицей протеинкиназного комплекса, который играет важную роль при прохождении фазы G1 клеточного цикла. Активность этой киназы ограничена переходом от G1 к S-фазе во время клеточного цикла, и ее экспрессия контролируется, в первую очередь, на транскрипционном уровне (Xiao et al., 2007). Ферменты CDK4 и CDK6 и их регуляторы, например, циклины, играют ведущие роли при эмбриогенезе, гомеостазе и онкогенезе (Graf et al., 2010).

В тканях рака легких уровень экспрессии белка CDK4 был значимо повышен в сравнении с нормальными тканями ($P < 0,001$). Период общей выживаемости был значительно более коротким у пациентов с более высоким уровнем экспрессии CDK4, чем у пациентов с низким уровнем экспрессии CDK4. Многомерный анализ позволяет предположить, что уровень экспрессии CDK4 был независимым прогностическим индикатором ($P < 0,001$) для выживаемости пациентов, больных раком легких. Более того, подавление экспрессии CDK4 также значительно повышало экспрессию регулятора клеточного цикла p21 (Wu et al., 2011a). В клетках легких, которые экспрессируют эндогенный онкоген K-Ras, абляция Cdk4, но не Cdk2 или Cdk6, индуцирует немедленную реакцию клеточного старения. Эта реакция не происходит в клетках легких, экспрессирующих отдельный аллель Cdk4, или в других K-Ras-экспрессирующих тканях. Нацеливание на аллели Cdk4 в опухолях поздних стадий, обнаруживаемых с помощью компьютерной томографии, также индуцирует старение и предотвращает прогрессирование опухоли (Puylol et al., 2010).

Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H1 (H) (HNRNP1) / гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H2 (H') (HNRNP2)

Данные гены принадлежат к подсемейству повсеместно экспрессированных гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (гЯРНП). гЯРНП – белки, связывающиеся с РНК и образующие комплекс с гетерогенной ядерной РНК (гЯРНК). Эти белки ассоциированы с пре-мРНК в ядре

и, по всей видимости, влияют на процессинг пре-мРНК и другие аспекты метаболизма и транспорта мРНК.

гяРНП, вероятно, задействован в патогенезе и прогрессировании злокачественных глиом, будучи центром онкогенного переключателя для сплайсинга, который, возможно, отражает реактивацию паттернов стволовых клеток и опосредует многочисленные ключевые аспекты агрессивного поведения опухоли, включая уклонение от апоптоза и инвазивность (Lefave et al., 2011). Нокдаун гяРНП H или A-Raf, опосредованный малой интерферирующей РНК, приводил к MST2-зависимому апоптозу. Напротив, усиленная экспрессия гяРНП H или A-Raf частично препятствовала апоптозу, индуцированному этопозидом (Rauch et al., 2010). Повышенный уровень гяРНП H/H' обнаружен в некоторых тканях, которые в нормальных условиях экспрессируют низкие цитоплазматические уровни гяРНП H/H', например, это аденокарцинома поджелудочной железы, гепатоклеточная карцинома и карцинома желудка (Honore et al., 2004).

Белок 2, содержащий тетратрикопептидный повтор, анкириновый повтор и биспиральный домен (TANC2)

Семейство TANC включает TANC1 и TANC2, которые были идентифицированы в 2005 г. (Han et al., 2010). Белки семейства TANC задействованы в регуляции дендритных шипиков, пространственном обучении и эмбриональном развитии, поскольку недостаток TANC1 у мышей снижает плотность шипиков в гиппокампе и нарушает пространственное обучение, причем недостаток TANC2 вызывает эмбриональную смерть. Напротив, избыточная экспрессия TANC1 и TANC2 в культуре нейронов увеличивает плотность дендритных шипиков и возбудительных синапсов. Белки TANC1 и 2, в основном, экспрессируются в головном мозге, где значительная доля белка находится в мембранах мелких синаптических везикул (Han et al., 2010).

Белок с доменом Ring finger 213 (RNF598)

RNF213 кодирует белок, содержащий RING-домен типа C3HC4, являющийся специальным доменом цинкового пальца, который связывает два атома цинка и считается участвующим в опосредовании межбелкового взаимодействия.

Исследовательская группа представила доказательства, впервые позволяющие предположить, что RNF213 участвует в развитии генетической предрасположенности к болезни Мойя-Мойя

(Liu et al., 2011b). В другом исследовании было показано, что ген RNF213 имел отношение к генетической предрасположенности к болезни Мойя-Мойя в популяции ханьцев в Китае (Wu et al., 2012).

Семейство транспортеров растворенных веществ 34 (фосфат натрия), член 2 (SLC34A2)

SLC34A2 – это рН-чувствительный натрий-зависимый транспортер фосфата. Повышенный уровень экспрессии гена SLC34A2 в хорошо дифференцированных опухолях может отражать процессы клеточной дифференциации во время онкогенеза в яичнике и мог бы служить потенциальным маркером для постановки диагноза рака яичника и прогноза его течения (Shyian et al., 2011). ПЦР с обратной транскрипцией подтвердила повышенный уровень экспрессии SLC34A2 в клетках папиллярной карциномы щитовидной железы (Kim et al., 2010b). Значительно повышенный уровень экспрессии гена SLC34A2 наблюдался также среди тканей рака молочной железы по сравнению с нормальными тканями (Chen et al., 2010a).

Белок 3, содержащий SET и MYND-домены (SMYD3)

Первоначально сообщалось, что повышенный уровень SMYD3, лизин-4-специфичной метилтрансферазы гистона H3, играет ключевую роль в пролиферации клеток колоректальной карциномы (КРК) и гепатоклеточной карциномы (ГКК). В другом исследовании было обнаружено, что экспрессия SMYD3 была также повышенной в значительном большинстве тканей рака молочной железы. В равной степени, что и при КРК и ГКК, сайленсинг гена SMYD3 с помощью введения малой интерферирующей РНК приводило к ингибированию роста раковых клеток молочной железы, позволяя сделать предположение, что повышенная экспрессия SMYD3 также необходима для пролиферации раковых клеток молочной железы (Hamamoto et al., 2006). Нокдаун SMYD3 РНК-интерференцией снижает уровень экспрессии c-Met и ингибирует миграцию и инвазию клеток, вызванную HGF (Zou et al., 2009). SMYD3 играет важнейшую роль в пролиферации и миграции/инвазии клеток HeLa и может быть полезной как терапевтическая мишень при карциномах шейки матки человека (Wang et al., 2008b).

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

AKR1C1 и AKR1C2 различаются лишь семью аминокислотными остатками (Le et al., 2010). AKR1C1 и AKR1C2 регулируют активность андрогенов, эстрогенов и прогестерона и степень занятости и трансактивацию соответствующих рецепторов (Penning et al., 2000; Steckelbroeck

et al., 2004). Ферменты AKR1C за исключением AKR1C4, специфичного для печени, экспрессируются в различных нормальных и пораженных заболеванием тканях и, таким образом, соотносятся с несколькими заболеваниями, такими как рак легких, молочной железы, предстательной железы, эндометриальный рак, миелоидная лейкемия и другими (Brozic et al., 2011; Burns et al., 2011). Чувствительность к цисплатину, как оказалось, была ассоциирована с уровнями AKR1C в клеточных линиях эпителиального рака легких (Chen et al., 2010b) и у пациентов с НМРЛ (Kuang et al., 2012; Stewart, 2010). Избыточная экспрессия AKR1C является, таким образом, индикатором плохого прогноза и химиорезистентности при немелкоклеточном раке легкого человека (НМРЛ) (Wang et al., 2007). Избыточная экспрессия AKR1C2 также ассоциирована с прогрессированием заболевания при раке предстательной железы (Huang et al., 2010). Элиминация экспрессии AKR1C2 с помощью интерферирующей РНК ингибирует онкогенез *in vivo* и *in vitro*, что дает все основания предполагать, что siРНК AKR1C2 может играть важнейшую роль в блокировании гепатоканцерогенеза (Dong-Dong, 2007).

Ретикулокальбин 1, кальций-связывающий EF-hand домен (RCN1) / ретикулокальбин 3, кальций-связывающий EF-hand домен (RCN3)

Ретикулокальбин 1 является кальций-связывающим белком, находящимся в полости эндоплазматического ретикулума. Иммуногистохимическое исследование продемонстрировало широкое распространение RCN в различных органах плода и взрослого человека, преимущественно в эндокринных и экзокринных органах. Избыточная экспрессия RCN может играть роль при онкогенезе, опухолевой инвазии и развитии резистентности к лекарственным средствам (Fukuda et al., 2007). Ретикулокальбин 1 (RCN1) – это белок, ассоциированный с клеточной поверхностью, как на клеточных линиях эндотелиального рака, так и рака предстательной железы. Высокий уровень экспрессии RCN1 на клеточной поверхности наблюдался при обработке эндотелиальных клеток костного мозга фактором некроза опухоли-альфа (Cooper et al., 2008). Уровень RCN1 повышен при колоректальной карциноме (КРК) и был локализован в раковых клетках или клетках стромы рядом с раковыми клетками. Он мог бы стать новым кандидатом в маркеры КРК (Watanabe et al., 2008). RCN3 является членом семейства CREC (Cab45/ретикулокальбин /ERC45/калуменин) домен Ca²⁺ EF-hand-связывающих белков, локализованных в секреторном пути (Tsuji et al., 2006). RCN3 предлагается в качестве потенциально важного гена-кандидата при олигодендроглиомах. Несмотря на это, о функциях RCN3 известно мало (Drucker et al., 2009).

Интерлейкин 8 (ИЛ8)

ИЛ8 – это хемокин семейства СХС, являющийся одним из важнейших медиаторов воспалительного ответа. Этот хемокин вырабатывается различными типами клеток. Он действует как хемоаттрактант и является также сильным ангиогенным фактором. Хемокины СХС (ELR+), такие как ИЛ8, индуцируют ангиогенез и могут быть важны при видах рака, имеющих ангиогенный фенотип, таких как НМРЛ (Arenberg et al., 1997). Недавно было обнаружено, что полученный из пробы опухоли ИЛ8 действовал как аттрактант для циркулирующих опухолевых клеток для их возвращения к исходной опухоли (рак молочной железы, рак толстой кишки и меланомы), приводя к более агрессивному фенотипу опухоли (Kim et al., 2009). Уровни ИЛ-8 ассоциированы с риском возникновения рака легких за несколько лет до постановки диагноза. В комбинации ИЛ-8 и СРР являются более стабильными биомаркерами для предсказания возникновения рака легких (Pine et al., 2011). Активирующие мутации KRAS или EGFR повышают уровень экспрессии ИЛ-8 при НМРЛ; ИЛ-8 экспрессируется на высоком уровне в пробах НМРЛ мужчин, курящих лиц, пациентов пожилого возраста, НМРЛ с плевральным поражением и аденокарцином с KRAS-мутациями; и ИЛ-8 играет роль в росте и миграции клеток при НМРЛ, вызванном онкогенной мутацией KRAS (Sunaga et al., 2012).

Пиримидинергический рецептор P2Y, G-белок-связанный, 6 (P2RY6)

P2RY6 принадлежит к семейству G-белок-связанных рецепторов. В это семейство входят несколько подтипов рецепторов с различной фармакологической селективностью, которые иногда перекрываются, для различных аденозиновых и уридиновых нуклеотидов. Подтип P2Y6 экспрессируется на особенно высоком уровне в плаценте, позволяя предположить, что P2Y6 играет важную роль в выполнении функций плаценты. Тем не менее, локализация P2Y6 в клетках внутри плаценты неизвестна. P2Y6 может играть важную роль в развитии трофобластической болезни, дифференциации и неоплазии (Somers et al., 1999). Важная роль была приписана пиримидин-активируемому рецептору P2Y в воспалительной реакции легочного эпителия (Schafer et al., 2003).

Белок 1, содержащий HECT, UBA и WWE-домены, E3 убиквитинпротеинлигаза (HUWE1)

HUWE1 кодирует члена семейства убиквитинлигаз HECT E3. Домен HECT находится на С-конце и содержит цистеин в активном центре, который образует промежуточную связь между убиквитином и тиоэфиром.

ARF-ВР1 (HУWE1) является основным медиатором как р53-независимых, так и р53-зависимых функций ARF по подавлению опухолей. Как таковой, ARF-ВР1 может служить в качестве потенциальной мишени при терапевтическом вмешательстве в опухоль вне зависимости от статуса р53 (Chen et al., 2005a). Инактивация ARF-ВР1 стабилизировала р53 и индуцировала апоптоз (Chen et al., 2006). HУWE1 (HectH9) экспрессируется в избытке клетками многих опухолей человека и необходим для пролиферации субпопуляции опухолевых клеток (Adhikary et al., 2005; Zhang et al., 2011a). При раке молочной железы уровень HУWE1 находился в значимой корреляционной зависимости с соответствующими прогностическими факторами и клиническим исходом (Confalonieri et al., 2009).

Версикан (VCAN)

VCAN является членом семейства протеогликанов – агрекана и версикана. Известно, что VCAN ассоциирован с множеством молекул внеклеточного матрикса, включая гиалуронан, тенасцин, фибулин-1, фибронектин, CD44 и L-селектин, фибрилин, интегрин и связующий белок (Zheng et al., 2004). VCAN экспрессируется во многих тканях. Он экспрессируется в большом количестве на ранних стадиях развития тканей, и уровень его экспрессии снижается после созревания ткани. Уровень его экспрессии также повышен во время репарации ран и роста опухоли (Ghosh et al., 2010). Нокдаун VCAN РНК-интерференцией в клетках аденокарциномы легких человека (A549) в значительной степени ингибировал рост опухоли *in vivo*, но не *in vitro* (Creighton et al., 2005). VCAN является непосредственной мишенью р53. Высокая экспрессия VCAN также была обнаружена в стромальной ткани перитуморальной области на ранних стадиях рака предстательной железы и рака молочной железы, и он ассоциирован с агрессивным поведением опухоли (Yoon et al., 2002).

Рибонуклеаза III Droscha (DROSHA)

Droscha – это фермент Рназа III 2 класса, отвечающий за инициацию процессинга микроРНК (miРНК), или коротких молекул РНК, экспрессируемых клеткой в естественных условиях, которые регулируют широкий спектр других генов за счет взаимодействия с РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) в целях инициации расщепления комплементарной информационной РНК (иРНК) как части пути иРНК. Молекула микроРНК синтезируется как первичный транскрипт (длинная молекула) РНК, известный как pri-miРНК, который расщепляется ферментом Droscha с получением характерной структуры типа «стебель-петля», имеющей около 70 пар нуклеотидов в длину и называемой pre-miРНК (Lee et al., 2003).

Drosha существует как часть белкового комплекса, называемого «Микропроцессорный комплекс», который содержит также связывающий двухнитевую РНК белок Pasha (известный также как DGCR8) (Denli et al., 2004), который необходим для выполнения функций Drosha и способен связываться с одноцепочечными фрагментами pri-miРНК, необходимыми для правильного процессинга (Han et al., 2006). Drosha человека был клонирован в 2000 г., когда его идентифицировали как ядерную двухцепочечную рибонуклеазу, задействованную в процессинге рибосомальных предшественников РНК (Wu et al., 2000). Drosha стал первым человеческим ферментом РНазой III, который был идентифицирован и клонирован. Два других человеческих фермента, которые участвуют в процессинге и функциональной активности микроРНК – это белки Дайсер (Dicer) и Аргонавт (Argonaute). Оба фермента, Drosha и Pasha, локализованы у клеточного ядра, где происходит процессинг pri-miРНК в pre-miРНК. Полученная в результате молекула процессируется затем в клеточной цитоплазме белком Dicer РНазой в зрелую miРНК (Lee et al., 2003). Drosha и другие ферменты, участвующие в процессинге miРНК, могут быть важны в прогнозе раковых заболеваний (Slack and Weidhaas, 2008).

Белок, содержащий плекстрин-гомологичный домен, семейство А (связывающий с фосфоинозитид-специфичный), член 8 (PLEKHA8)

Ген для адаптора 2 фосфатидилинозитол-4-фосфата (FAPP2 = PLEKHA8) кодирует цитоплазматическую липидтрансферазу с плекстрин-гомологичным доменом, который был задействован в процессе созревания везикул и транспорте от транс-Гольджи-сети в плазматическую мембрану (Сао et al., 2009). Введение рибозимов, нацеленных на ген FAPP2, в клетки карциномы толстой кишки вызывало их апоптоз в присутствии антител к Fas. Клетки глиомы и рака молочной железы, трансфицированные малой интерферирующей РНК FAPP2, также демонстрировали существенное повышение апоптоза (Tritz et al., 2009). В более поздних исследованиях подчеркивается роль FAPP2 как липидпереносящего белка, задействованного в метаболизме гликофинголипида в комплексе Гольджи (D'Angelo et al., 2012). Фосфоинозитол-4-фосфат адаптерный белок-2 (FAPP2) играет ключевую роль в выработке гликофинголипидов (GSL) при использовании своего С-концевого домена для транспорта только что синтезированного глюкозилцерамида из прилегающей к цитозоли глюкозилцерамид-синтазы в цис-область аппарата Гольджи для последующего анаболического процессинга (Kamlekar et al., 2013).

Ацетил-КоА-карбоксилаза-альфа (АСАСА)

АСАСА – это биотин-содержащий фермент, который катализирует карбоксилирование ацетил-КоА до малонил-КоА, лимитирующую стадию в процессе синтеза жирных кислот (Tong

and Harwood, Jr., 2006). Повышение уровня ACACA было выявлено при многих видах рака человека, и оно способствует тому, чтобы липогенез удовлетворял потребность раковых клеток в их быстром росте и пролиферации. Поэтому ACACA может быть эффективной мишенью для вмешательства в развитие раковых заболеваний, а ингибиторы, разработанные для лечения метаболических заболеваний, могли бы стать потенциальными терапевтическими средствами в рамках противораковой терапии (Wang et al., 2010a). В двух исследованиях было продемонстрировано, что сайленсинг гена ACACA с помощью РНК интерференции приводит к ингибированию роста и вызывает клеточную смерть практически в такой же степени, как это наблюдается после подавления экспрессии гена FASN (Brusselmans et al., 2005; Chajes et al., 2006). TOFA (5-тетрадецил-окси-2-фуранкарбоновая кислота), аллостерический ингибитор ACACA, является цитотоксическим для клеток рака легкого NCI-H460 и клеток колоректальной карциномы HCT-8 и HCT-15, и вызывает апоптоз (Wang et al., 2009a). Другой высокоэффективный ингибитор ACACA, сорафен А, блокирует липогенез и усиливает окисление жирных кислот в клетках рака предстательной железы. Раковые клетки прекращают пролиферировать и окончательно погибают (Beckers et al., 2007). Эти сведения позволяют предположить, что кроме аккумуляции малонил-КоА, ингибирование липогенеза само по себе может вызывать смерть раковых клеток, и что, наконец, ACACA может быть мишенью при антинеопластической терапии (Brusselmans et al., 2005).

Интегрин, альфа 11 (ITGA11)

Интегрины играют важнейшую роль в различных клеточных процессах и процессах развития, включая клеточный рост, дифференциацию и выживаемость, а также онкогенез, инвазию раковых клеток и метастазирование. Интегрин альфа 11 (ITGA11/альфа11) локализован в стромальных фибробластах и обычно в избытке экспрессируется клетками немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). мРНК альфа11 была экспрессирована в избытке как в клетках аденокарциномы легких, так и клетках плоскоклеточной карциномы (Wang et al., 2002). Сообщалось, что альфа11 играет важную роль в способности фибробластов стимулировать рост клеток НМРЛ *in vivo*, и эта функция отчасти опосредуется его регуляцией экспрессии IGF2 (Zhu et al., 2007). В отношении клиникопатологических характеристик пациентов с НМРЛ избыточная экспрессия генов hMTH1, SPD, HABP 2, ITGA11, COL11A1 и СК-19 имела значимую корреляцию с патологической стадией ($p < 0,05$). Более того, избыточная экспрессия hMTH1, SPD, ITGA11 и COL11A1 коррелировала с метастазами в лимфатических узлах и плохим прогнозом (Chong et al., 2006).

Коллаген, тип XII, альфа 1 (COL12A1)

Ген COL12A1 кодирует альфа-цепь коллагена типа XII, члена семейства коллагенов FACIT (ассоциированные с фибриллами коллагены с прерываемыми тройными спиралями). Коллаген типа XII является гомотримером, взаимосвязанным, как было обнаружено, с коллагеном типа I. Как считается эта взаимосвязь модифицирует взаимодействие коллагена типа I с фибриллами и окружающим матриксом (Oh et al., 1992). COL12A1 может быть задействован в регуляции базальных мембран, образуя специфические молекулярные мостики между фибриллами и другими компонентами матрикса (Thierry et al., 2004). COL12A1 экспрессируется в сердце, плаценте, легких, скелетных мышцах и поджелудочной железе (Dharmavaram et al., 1998), в разнообразных соединительных тканях, включая суставной и эпифизарный хрящ (Gregory et al., 2001; Walchli et al., 1994; Watt et al., 1992). Уровень экспрессии COL12A1 был понижен в опухолях, характеризующихся высокой микросателлитной нестабильностью, при сравнении со стабильной группой с низкой микросателлитной нестабильностью или без нее (Ortega et al., 2010).

Нейтрофильная эластаза (ELANE)

Нейтрофильная эластаза (или лейкоцитарная эластаза), также известная как ELA2 (эластаза 2, нейтрофильная), является сериновой протеиназой, относящейся к тому же семейству, что и химотрипсин, и обладает широкой субстратной специфичностью. Секретируемая нейтрофилами во время воспалительного процесса, она разрушает бактерии и ткань хозяина (Belaouaj et al., 2000). Человеческая нейтрофильная эластаза (ELANE), играющая главную роль в развитии хронических обструктивных заболеваний легких, как было недавно обнаружено, задействована в прогрессировании немелкоклеточного рака легкого. Она может действовать на нескольких уровнях (i) внутриклеточно, удаляя адаптерные молекулы субстрата-1 инсулинового рецептора (IRS-1) (ii) на поверхности клетки, гидролизуя такие рецепторы как CD40 (iii) во внеклеточном пространстве, вырабатывая фрагменты эластина, т. е. морфоэластокины, которые активно стимулируют инвазивность раковых клеток и ангиогенез (Moroy et al., 2012). Нейтрофильная эластаза непосредственно вызывала пролиферацию опухолевых клеток аденокарцином легких как у людей, так и у мышей, получая доступ к эндосомальному компартменту внутри опухолевых клеток, где она расщепляла субстрат-1 инсулинового рецептора (IRS-1) (Houghton et al., 2010).

Ингибитор серпин-пептидазы, клада В (овальбумин), член 3 (SERPINB3)

Антиген плоскоклеточной карциномы (SCCA), также называемый SERPINB3, является членом семейства высокомолекулярных ингибиторов серпин-пептидазы (серпины) (Suminami et

al., 1991). О высоких уровнях экспрессии сообщалось при раке тканей головы и шеи и других видах эпителиального рака (Тогге, 1998). Сообщалось об избыточной экспрессии SCCA в опухолевых тканях в сравнении с тканью перитуморальной зоны, что позволяет предположить, что он может играть роль потенциального маркера для гистологического выявления гепатоцеллюлярной карциномы (ГКК) (Pontisso et al., 2004). Серпин В3/В4, в особенности серпин В4, по всей видимости, играет важную роль в aberrантной пролиферации эпителия. Оценка серпина В3/В4 могла бы иметь прогностическое значение при прогнозе прогрессирования заболевания, в особенности у пациентов с повышенной предрасположенностью к раку легких (Calabrese et al., 2012). С одной стороны, SCCA1 (SERPINB3) ингибирует клеточную гибель, вызываемую повреждением лизосом, тогда как, с другой стороны, он сенсibiliзирует клетки к ЭР-стрессу, активируя каспазу-8 вне зависимости от апоптотического пути гибели клеток (Ullman et al., 2011). Некоторые факты указывают на важную роль SERPINB3 в инициации разрушения эпидермального барьера. SERPINB3 может быть определяющим фактором барьерной функции в эпидермисе (Katagiri et al., 2010).

Член семейства кинезинов 26В (KIF26B)

Кинезин – это белок, принадлежащий к классу моторных белков, обнаруженных в эукариотических клетках. Кинезины движутся вдоль филаментов микротрубочек, получая энергию от гидролиза АТФ (таким образом, кинезины являются АТФазами). Kif26b, ген семейства кинезинов, представляет собой мишень для Sall1 по ходу транскрипции (Nishinakamura et al., 2011). Kif26b необходим для развития почек, поскольку он регулирует адгезию мезенхимальных клеток, находящихся в контакте с зачатком мочеточника. Избыточная экспрессия Kif26b *in vitro* вызывала повышенную клеточную адгезию за счет взаимодействий с немышечным миозином (Terabayashi et al., 2012; Uchiyama et al., 2010).

Анкилоз, прогрессивный гомолог (мышь) (ANKH)

ANKH (человеческий гомолог белка прогрессирующего анкилоза) регулирует транспорт неорганического пирофосфата (PPi) через клеточную мембрану (Wang et al., 2008a). Некоторые данные позволяют предположить, что экспрессия ANKH и его функциональная активность *in vitro* и *in vivo* подавляются в условиях гипоксии, и что влияние регулируется HIF-1 (Zaka et al., 2009). Человеческий ген ANKH экспрессируется *in vivo* ткань-специфическим образом, причем наивысший уровень экспрессии мРНК был обнаружен в головном мозге, сердце и скелетных мышцах (Guo et al., 2001). Мутации гена ANKH были ассоциированы с аутосомно-доминантным

нантной краниометафизарной дисплазией (Kornak et al., 2010). Уровень ANKH был значительно повышен в клеточных линиях рака шейки матки с амплификациями по сравнению с клеточными линиями без амплификаций (Kloth et al., 2007). Амплификация геномной последовательности участков на плече хромосомы 5p часто наблюдалась при мелкоклеточном раке легких (МРЛ), что предполагает присутствие множества онкогенов на этом плече. Сое и соавт. описали идентификацию микроделечий, которым удалось уклониться от обнаружения стандартными методами диагностики, и идентификацию генов TRIO и ANKH в качестве новых предполагаемых онкогенов (Coe et al., 2005).

Фактор ядерного экспорта РНК1 (NXF1)

В человеческих клетках фактор экспорта мРНК, NXF1, находится в нуклеоплазме и в ядерных поровых комплексах (Zhang et al., 2011b). Транспорт мРНК из сайта транскрипции в ядре в сайт трансляции в цитоплазме является необходимым процессом при экспрессии генов эукариот. В человеческих клетках фактор экспорта мРНК NXF1 (также известный под названием TAP) сопровождает транскрипты мРНК из ядра при одновременном связывании мРНК, адаптерных белков мРНК и повторов фенилаланин–глицин (FG) ядерного порового комплекса (Kelly and Corbett, 2009). NXF1 является уникальным среди факторов ядерного транспорта, поскольку это мультидоменный белок, который не имеет сходства ни по структурам, ни по механизму с белками кариоферинами, которые транспортируют белковые грузы, тРНК и микроРНК через ядерный поровый комплекс. Экспорт мРНК посредством NXF1 является процессом, который происходит независимо от ГТФазы Ran (Gruter et al., 1998). Ядерный экспорт мRNP опосредуется транспортными факторами, такими как NXF1, который связывает мRNP и опосредует их транслокацию через центральный канал ядерного порового комплекса (ЯПК) за счет взаимодействий с FG-нуклеопоринами (Wickramasinghe et al., 2010). Транспорт мРНК может осуществляться как путями массового экспорта с участием NXF1/TAP, так и более специализированными путями, в которых задействован белок сохранения области хромосомы 1 (CRM1) (Siddiqui and Borden, 2012).

Регулятор передачи сигналов через G-белок 4 (RGS4)

RGS4 действует в качестве белка, ускоряющего действие ГТФазы, в модуляции сигнальных путей μ - и δ -опиоидных рецепторов (MOR и DOR, соответственно). Снижение уровня RGS4, вызванное опиоидным агонистом, осуществляется за счет убиквитин-протеасомного сигнального пути и может участвовать в сохранении клеточного гомеостаза в морфин-зависимом состоянии (Wang and Traunor, 2011). RGS4 играет важную роль в регулировании бета-клеточной

функции (Ruiz, I et al., 2010). Xie и соавт. предложили RGS4 в качестве нового супрессора клеточной миграции и инвазии при раке молочной железы, являющихся важными этапами метастатического каскада (Xie et al., 2009). RGS4 экспрессировался в избытке клетками карциномы щитовидной железы. Эффективное снижение уровней его экспрессии в раковых клетках щитовидной железы значительно ослабляло жизнеспособность раковых клеток щитовидной железы, указывая на значимую роль RGS4 в онкогенезе щитовидной железы (Nikolova et al., 2008). RGS4 дифференциально экспрессировался в клеточной линии опухоли поджелудочной железы человека и, как было обнаружено, является возможным геном-маркером для локальной инвазии опухоли и развития метастазов в печени при карциноме поджелудочной железы (Niedergethmann et al., 2007). Избыточная экспрессия RGS4 приводила к замедлению и изменениям в процессе тубуляции эпителиальных клеток легких за счет селективного ингибирования G-белок опосредованной активации p38 MAPK и, следовательно, за счет снижения пролиферации, миграции эпителиальных клеток и уровня экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) (Albig and Schiemann, 2005).

Глютамин-фруктозо-6-фосфаттрансаминаза 2 (GFPT2)

GFPT2 участвует в росте аксонов, ранних стадиях развития нейронов, сигнальной трансдукции/синтезе нейропептидов и в реализации рецепторами нейромедиаторов их функций (Tondreau et al., 2008). Генетические варианты GFPT2 ассоциированы с диабетом 2 типа и диабетической нефропатией (Zhang et al., 2004). Кроме того, ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов в GFPT2 предполагает, что ген, задействованный в модуляции пути окислительного распада, мог бы быть основным виновником хронической почечной недостаточности при сахарном диабете (Prasad et al., 2010). Метилирование ДНК гена GFPT2 оценивали в образцах первичной острой лимфобластной лейкемии (ALL). Пациенты с несколькими метилированными CpG-островками имели худшую общую выживаемость (Kuang et al., 2008). GFPT2 играет роль в метаболизме глутамина и, как наблюдалось, его уровни экспрессии выше в мезенхимальных клеточных линиях. Метаболизм глутамина может играть важную роль в прогрессировании опухоли, и ингибиторы путей клеточного метаболизма могут быть формой эпигенетической терапии (Simpson et al., 2012).

Молекула адгезии эндотелиальных клеток головного мозга (CERCAM)

CERCAM локализован на поверхности эндотелиальных клеток (Starzyk et al., 2000) и картирован на хромосоме 9q34.11, регионе-кандидате на 9q, как было установлено, взаимосвязанном с наследственным идиопатическим сколиозом (Miller et al., 2012). Ген CEECAM1 широко

транскрибируется в нервной системе и в нескольких секреторных тканях, таких как слюнные железы, поджелудочная железа, печень и плацента (Schegg et al., 2009). Белок CERCAM имеет схожую структуру с ColGalT-ферментами GLT25D1 и GLT25D2. Несмотря на то, что его функция до сих пор неизвестна, он, вероятно, функционально отличается от родственного белка GLT25D1 и не выполняет функции гликозилтрансферазы, как белки GLT25D1 и GLT25D2 (Perrin-Tricaud et al., 2011).

УДФ-N-ацетил-альфа-D-галактозамин: полипептид N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 2 (GalNAc-T2) (GALNT2)

GALNT2 катализирует первый этап в O-гликозилировании муцинового типа пептидов в аппарате Гольджи. Эти ферменты переносят N-ацетилгалактозамин (GalNAc) от УДФ-GalNAc к гидроксильной группе серина или треонина белков-мишеней (Peng et al., 2010). GALNT2 был экспрессирован конститутивно и на низких уровнях в большинстве или во всех исследованных клеточных линиях человеческой аденокарциномы поджелудочной железы, толстой кишки, желудка и молочной железы (Sutherlin et al., 1997). Исследования показали, что O-гликаны и гены GALNT играют ведущие роли в различных биологических функциях и развитии заболевания у человека. Риск заболевания эпителиальным раком яичника (Terry et al., 2010) и коронарной болезнью (Willer et al., 2008) были ассоциированы с однонуклеотидными полиморфизмами GALNT2. Аберрантное гликозилирование гликопротеина клеточной поверхности в связи со специфическими изменениями активности гликозилтрансферазы обычно ассоциируется с инвазией и метастазированием рака. GALNT2 участвует в миграции опухоли и инвазии при карциномах желудка (Hua et al., 2012), гепатоклеточной карциноме (ГКК) (Wu et al., 2011b) и злокачественной глиоме человека (Liu et al., 2011a).

Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин M (HNRNPM)

Ген HNRNPM относится к подсемейству повсеместно экспрессированных гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (гЯРНП). HNRNPM – распространенный компонент человеческого комплекса гЯРНП, который способен влиять на сплайсинг пре-мРНК, регулируя свой собственный сплайсинг пре-мРНК (Hase et al., 2006) или оказывая влияние на регуляцию альтернативного сплайсинга рецептора фактора роста фибробластов 2 (Hovhannisyan and Carstens, 2007). Протеомный анализ очищенных *in vitro* сплайсеосом выявил HNRNPM в пре-сплайсеосомном H-комплексе и по всей структуре сплайсеосомы (Rappsilber et al., 2002; Wahl et al., 2009). HNRNPM задействован в механизмах получения сплайсеосом за счет его взаимодей-

ствия со сплайсеосомным подкомплексом CDC5L/PLRG1 (Lleres et al., 2010). Некоторые результаты показывают, что цитоплазматическое удержание IMP-3 и HNRNPM в человеческих раковых клетках приводит к значительному спаду пролиферации. Ядерный комплекс IMP-3-HNRNPM важен для эффективного синтеза CCND1, D3 и G1 и для пролиферации человеческих раковых клеток (Rivera et al., 2013).

Базонуклин 1 (BNC1)

Базонуклин – это белок семейства цинковых пальцев с очень ограниченным распределением по тканям (Tseng, 1998). Вплоть до настоящего времени базонуклин был, в основном, обнаружен, на базальных кератиноцитах многослойного плоского эпителия (кожа, эпителий ротовой полости, пищевод, влагалище и роговая оболочка глаза) и в гаметогенных клетках семенника и яичника (Tseng and Green, 1994; Weiner and Green, 1998). Сейчас существует множество свидетельств того, что базонуклин является клеткоспецифическим транскрипционным фактором для генов рНК (рДНК). Цинковые пальцы базонуклина взаимодействуют с тремя эволюционно консервативными сайтами внутри промотора рДНК (Iuchi and Green, 1999; Tseng et al., 1999). Эпигенетическое регулирование с помощью метилирования CpG играет важную роль в онкогенезе, а также в ответе на противораковую терапию. BNC1 был гипометилирован в радиорезистентных клеточных линиях H1299 немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека. Подавление мРНК-экспрессии BNC1 в клетках H1299 также снижало устойчивость этих клеток к ионизирующему излучению (Kim et al., 2010a). Аберрантное ДНК-метилирование BNC1 было также обнаружено в образцах хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL) (Tong et al., 2010). При почечно-клеточной карциноме (ПКК) метилирование BNC1 было ассоциировано с худшим прогнозом вне зависимости от размера, стадии и степени злокачественности опухоли (Morris et al., 2010).

FK506-связывающий белок 10, 65 кДа (FKBP10)

FK506-связывающий белок 10 (FKBP10) принадлежит к семейству пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы типа FKBP. Он локализован в эндоплазматическом ретикулуме и выступает в качестве молекулярного шаперона (Ishikawa et al., 2008; Patterson et al., 2000). Он высоко экспрессирован при развитии легких и может быть реактивирован в согласованном порядке с помощью белков внеклеточного матрикса после повреждения легких (Patterson et al., 2005).

Рецептор семейства Frizzled 1 (FZD1), рецептор семейства Frizzled 2 (FZD2), рецептор семейства Frizzled 7 (FZD7)

Гены FZD2, FZD1 и FZD7 – все принадлежат к семейству Frizzled; члены этого семейства генов кодируют белки, имеющие 7 трансмембранных доменов, являющиеся рецепторами белков сигнального пути Wnt.

Экспрессия гена FZD2, видимо, регулируется в соответствии с уровнем развития, имея высокие уровни экспрессии в эмбриональных почках и легких и во взрослом толстом кишечнике и яичнике (Sagara et al., 1998; Zhao et al., 1995).

Белок FZD1 содержит сигнальный пептид, богатый цистеином домен в N-концевом внеклеточном участке, 7 трансмембранных доменов и C-концевой мотив, связывающий PDZ-домен. Транскрипт FZD1 экспрессирован в различных тканях, включая легкие, а также сердце, почки, поджелудочную железу, предстательную железу и яичник (Sagara et al., 1998). Повышенный уровень экспрессии рецепторов 1 и 2 семейства Frizzled был обнаружен в клетках рака молочной железы (Milovanovic et al., 2004).

Белок FZD7 содержит N-концевую сигнальную последовательность, 10 остатков цистеина, типичных для богатого цистеином внеклеточного домена членов семейства Fz, 7 предполагаемых трансмембранных доменов и внутриклеточный C-концевой фрагмент («хвост») с мотивом, связывающим PDZ-домен. Экспрессия гена FZD7 может угнетать функцию APC и усиливать передачу бета-катенин-опосредованных сигналов в плохо дифференцированных карциномах пищевода человека (Sagara et al., 1998; Tanaka et al., 1998).

АТФаза, транспортирующая Ca⁺⁺, сердечная мышца, быстросокращающаяся 1 (АТР2А1), АТФаза, транспортирующая Ca⁺⁺, сердечная мышца, быстросокращающаяся 2 (АТР2А2)

Оба гена (АТР2А1 и АТР2А2) кодируют SERCA Ca(2+)-АТФазы. Кальциевые АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР)1/ЭР (SERCA) являются кальциевыми насосами, которые объединяют гидролиз АТФ с транспортом кальция через мембрану СР/ЭР (MacLennan et al., 1997). SERCA кодируются тремя гомологичными генами: SERCA1 (АТР2А1), SERCA2 (АТР2А2) и SERCA3 (Wu et al., 1995). Появились некоторые доказательства того, что SERCA может оказывать прямое влияние на процессы апоптоза, дифференциации и клеточной пролиферации (Chami et al., 2000; Ma et al., 1999; Sakuntabhai et al., 1999).

Мутации гена АТР2А1, кодирующего SERCA1, вызывают некоторые аутосомные рецессивные формы заболевания Броди, характеризующиеся увеличением нарушений релаксации мышц во время выполнения упражнений (Odermatt et al., 1996).

АТР2А2 – это АТФаза, ассоциированная с болезнью Дарье, редким, наследственным аутосомно-доминантным заболеванием кожи, характеризующимся аномальной кератинизацией и акантолизом (Huo et al., 2010). Изменения зародышевой линии АТР2А2 могут предрасполагать к раку легких и толстой кишки, а повреждения гена АТР2А2, возможно, участвуют в процессе онкогенеза (Korosec et al., 2006). В клеточной линии мелкоклеточного рака легкого (H1339) и аденокарциномы легкого содержание Ca^{2+} в ЭР было пониженным в сравнении с нормальным человеческим эпителием бронхов. Пониженный уровень Ca^{2+} коррелировал с пониженной экспрессией SERCA 2, перекачивающего кальций в ЭР (Bergner et al., 2009). АТР2А2 мог бы стать потенциальным прогностическим маркером для пациентов, больных колоректальным раком. Он был обнаружен в циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК), и вероятность послеоперационного рецидива имела значимую корреляцию с избыточной экспрессией гена (Huang et al., 2012).

Ламинин, гамма 2 (LAMC2)

Ламинины, семейство внеклеточных матричных гликопротеинов, являются основным неколлагеновым составляющим базальных мембран. Они задействованы во множестве биологических процессов, включая клеточную адгезию, дифференциацию, миграцию, передачу сигналов, отрастание нейритов и метастазирование. Ген LAMC2 кодирует цепь ламинин-5 $\gamma 2$, которая является частью ламинина-5, одного из основных компонентов зоны базальной мембраны. Уровень LAMC2 был часто повышен при деметилировании промотора при раке желудка (Kwon et al., 2011). Как было обнаружено, LAMC2 экспрессируется в избытке в ангиотропных зонах меланомы по сравнению с аваскулярными зонами меланомы (Lugassy et al., 2009). LAMC2 является биомаркером распространения метастазов при раке мочевого пузыря, и уровни его экспрессии ассоциировались со степенью злокачественности опухоли (Smith et al., 2009b). Гены LAMB3 и LAMC2 совместно экспрессировались в 21 из 32 клеточных линий немелкоклеточного рака легкого (66%), но только в одной из 13 клеточных линий мелкоклеточного рака легкого (8%). Совместная экспрессия генов LAMB3 и LAMC2 наблюдалась также во всех 4 исследованных случаях клеток первичного немелкоклеточного рака легкого, но не в соответствующих нераковых клетках легкого (Manda et al., 2000).

Белок теплового шока 2, 70 кДа (HSPA2), белок теплового шока 8, 70 кДа (HSPA8)

HSPA2 был идентифицирован в качестве белка, потенциально способствующего развитию рака, экспрессируемого на аномально высоких уровнях при различных видах рака человека, таких как рак молочной железы (Mestiri et al., 2001), рак шейки матки (Garg et al., 2010a), уротелиальный рак мочевого пузыря (Garg et al., 2010b), носоглоточная карцинома (Jalbout et al., 2003) и злокачественные опухоли (Chouchane et al., 1997). Некоторый уровень активности гена HSPA2 наблюдался также в клеточных линиях, полученных из нескольких видов раковых опухолей человека (Scieglinska et al., 2008), тогда как сайленсинг гена HSPA2 в раковых клетках приводил к блокировке роста и снижению онкогенного потенциала (Rohde et al., 2005; Xia et al., 2008). Более того, полиморфизм гена HSPA2 ассоциируется с повышенным риском развития рака легких (Wang et al., 2010b). Избыточная экспрессия HSPA2 коррелируется с повышенной клеточной пролиферацией, плохой дифференциацией и метастазами в лимфатических узлах при раке молочной железы человека, раке шейки матки и уротелиальном раке мочевого пузыря (Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b; Mestiri et al., 2001).

Ген HSPA8 кодирует члена 70 семейства белков теплового шока Hsc70, который содержит как индуцируемые теплом, так и конститутивно экспрессированные члены. HSPA8 связывается с формирующимися полипептидами, чтобы способствовать правильному сворачиванию белка (Beckmann et al., 1990). Hsc70 действует в качестве молекулярного шаперона, содействуя белковому синтезу, свертыванию, сборке, транспорту между клеточными компартментами и деградации (Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Hsc70 экспрессирован в незлокачественных клетках млекопитающих, а также в раковых тканях молочной железы (Као et al., 2003; Vargas-Roig et al., 1998), избыточная экспрессия Hsp/hsc70 в химиорезистентных раковых клетках (Ciocca et al., 1992; Lazaris et al., 1997) стала причиной исследований о возможных клинических маркерах этих белков (Ciocca and Calderwood, 2005). Существующая потенциальная функция этого секретируемого шаперона hsc70 при клеточной пролиферации может быть причиной более быстрого роста опухолевых клеток, экспрессирующих в избытке катепсин D (Nirde et al., 2010). Кроме того, Ruisin и соавт. сообщали об ассоциации между полиморфизмом этого гена и риском возникновения рака легких (Rusin et al., 2004).

Белок вакуолярной сортировки 13 гомолог В (дрожжи) (VPS13B)

VPS13B был идентифицирован в качестве периферического мембранного белка, локализованного в комплексе Гольджи, где он перекрывается с матричным белком GM130 цис-отдела Гольджи. Согласованно со своей субклеточной локализацией деплеция VPS13B при использовании интерферирующей РНК вызывает фрагментацию ленточной структуры Гольджи на

маленькие стопки (Seifert et al., 2011). Kolehmainen и соавт. (2003) идентифицировали ген SOH1, также известный как VPS13B, внутри участка, ответственного за синдром Коэна на хромосоме 8q22 (Kolehmainen et al., 2003). Мутации потери функции в гене VPS13B приводят к аутосомно-рецессивному синдрому Коэна (Seifert et al., 2011). Мутации VPS13B и других генов были описаны при раке желудка и колоректальном раке с микросателлитной нестабильностью (An et al., 2012).

Белок, подобный продукту гена CSE1, контролирующей сегрегацию хромосом (дрожжи) (CSE1L)

Было продемонстрировано, что ген предрасположенности к клеточному апоптозу (CSE1L) регулирует несколько клеточных механизмов, включая сверочную точку сборки веретена деления, а также пролиферацию и апоптоз. CSE1L находится как в цитоплазме, так и ядрах клетки. Ядерный CSE1L регулирует транскрипционную активность белка p53, основного белка-супрессора опухоли (Rao et al., 2011; Tanaka et al., 2007). Цитоплазматический CSE1L ассоциирован с микротрубочками; эта ассоциация, как было показано, стимулирует удлинение инвадоподий и усиливает миграцию опухолевых клеток (Tai et al., 2010). CSE1L высоко экспрессирован в клетках большинства видов рака, таких как доброкачественные и злокачественные меланоцитарные поражения кожи (Boni et al., 1999), эндометриальная карцинома (Peiro et al., 2001), карцинома яичника (Brustmann, 2004), рак молочной железы (Behrens et al., 2001), уротелиальные карциномы мочевого пузыря (Chang et al., 2012), и, как было продемонстрировано, его экспрессия коррелирует с прогрессированием рака. Сайленсинг гена CSE1L может стать потенциальным терапевтическим подходом при лечении рака толстой кишки (Zhu et al., 2013).

Дигидропиримидиназа-подобный белок 4 (DPYSL4)

Родственный дигидропиримидиназе белок 4 (DPYSL4) является известным регулятором развития нейронов гиппокампа. DPYSL4 задействован в регуляции роста, поляризации и дифференциации дендральных эпителиальных клеток во время морфогенеза зубного зачатка (Yasukawa et al., 2013). Некоторые исследования показали, что DPYSL4 участвует в ослаблении отрастания нейритов за счет ингибирования полимеризации микротрубочек, а также выявили его новую ассоциацию с виментином во время ядерной конденсации, предшествующей смерти нервных клеток (Aylsworth et al., 2009). Ген-супрессор опухоли p53, часто имеющий мутации при многих видах опухолей, играет важную роль в сохранении целостности генома.

Как экспрессия мРНК, так и белка DPYSL4, были специфически индуцированы противораковыми препаратами в p53-профицитных клетках. DPYSL4 – это фактор, индуцируемый при апоптозе и контролируемый p53 в ответ на повреждение ДНК (Kimura et al., 2011).

Субъединица Sec61 гамма (SEC61G)

SEC61 γ , гетеротримерный белковый канал, включающий субъединицы SEC61 α , β и γ , является членом транслокона SEC61 (Greenfield and High, 1999). Комплекс SEC61 формирует трансмембранные поры для транслокации зарождающихся полипептидов в просвет ЭР, а также для интеграции трансмембранных белков в бислой мембраны ЭР (Osborne et al., 2005). SEC61 γ необходим для выживания опухолевых клеток и для клеточных ответов на стресс эндоплазматического ретикулума. Кроме того, он в избытке экспрессирован в злокачественных клетках и практически отсутствует в нормальных клетках (Lu et al., 2009). Нокаунт экспрессии SEC61 γ приводил к апоптозу и подавлению сигнальных путей EGFR/АКТ по регуляции выживаемости (Lu et al., 2009), а также ингибированию роста опухолевых клеток (Neidert et al., 2012).

ORM1-подобный 1 (*S. cerevisiae*) (ORMDL1)

Человеческие гены (ORMDL1, ORMDL2 и ORMDL3) экспрессируются во всех взрослых и эмбриональных тканях. Они кодируют трансмембранные белки, «заякоренные» в эндоплазматическом ретикулуме, которые, вероятно, участвуют в сворачивании белков в ЭР. При анализе геномной последовательности Hjelmqvist и соавт. (2002) картировали ген ORMDL1 на участке хромосомы 2q32.2 (Hjelmqvist et al., 2002). Белки ORMDL являются основными регуляторами биосинтеза керамида в клетках млекопитающих (Siow and Wattenberg, 2012). Уровень экспрессии ORMDL1 специфически снижается в ассоциации с мутациями в гене презенилина 1 (PS1) (Araki et al., 2008).

Ресапех-подобный 3 (дрозофила) (PCNXL3)

Ресапех-подобный белок 3 (PCNXL3) является мульти-пропускным мембранным белком; он относится к семейству Ресапех.

Ген PCNXL3 был картирован на участке хромосомы 11q12.1-q13. Три новых опухолеассоциированных точки разрыва транслокации у человека были локализованы на участке хромосомы 11q13 между маркерами D11S4933 и D11S546. Таким образом, PCNXL3 может быть 11q13-ассоциированным геном предрасположенности к заболеванию (van et al., 2000).

Малый ядерный рибонуклеопротеин 200 кДа (U5) (SNRNP200)

Сплайсинг пре-мРНК катализируется сплайсосомой, комплексом из специализированной РНК и белковых субъединиц, который удаляет интроны из транскрибированного сегмента пре-мРНК. Сплайсосома состоит из малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРПП) U1, U2, U4, U5 и U6, насчитывающих вместе приблизительно 80 консервативных белков. SNRNP200 – это ген, требуемый для расплетания дуплекса U4/U6, этапа, необходимого для каталитической активации сплайсосомы (Maeder et al., 2009). Экспрессия SNRNP200 была обнаружена в сердце, головном мозге, плаценте, легких, печени, скелетных мышцах, почках и поджелудочной железе (Zhao et al., 2009). Недавно было обнаружено, что мутации в гене SNRNP200 ассоциированы с аутосомно-доминантной пигментной дегенерацией сетчатки (adRP) (Benaglio et al., 2011; Liu et al., 2012).

Домен SAM, домен SH3 и сигналы ядерной локализации 1 (SAMSN1)

SAMSN1 является членом нового семейства генов предполагаемых адаптеров и белков свертывания, содержащих домены SH3 и SAM (стерильный альфа-мотив). SAMSN1 экспрессируется в кроветворных тканях, мышцах, сердце, головном мозге, легких, поджелудочной железе, эндотелиальных клетках и клетках миелом. Высокие уровни эндогенной экспрессии SAMSN1, как было показано, имеются в первичных В-клетках под влиянием стимулов, вызывающих дифференциацию и пролиферацию. Эксперименты по трансдукции позволили сделать предположение о стимулирующей роли SAMSN1 при дифференциации В-клеток в клетки плазмы (Brandt et al., 2010). Клеточные линии и первичные клетки, полученные от пациентов с острой миелоидной лейкемией и множественной миеломой, экспрессируют SAMSN1 (Claudio et al., 2001). Уровень SAMSN1 был пониженным в клеточной линии крупноклеточной карциномы легкого Calu-6 (Yamada et al., 2008). Ген SAMSN1 экспрессировался в различной степени в тканях ассоциированного с язвенным колитом рака (Watanabe et al., 2011).

Передатчик сигналов и активатор транскрипции 2, 113 кДа (STAT2)

STAT2 в качестве нового фактора, способствующего онкогенезу при колоректальном раке и раке кожи, может повышать экспрессию гена и секретирование провоспалительных медиаторов, которые, в свою очередь, активируют онкогенный сигнальный каскад STAT3 (Gamero et al., 2010). STAT2 является важнейшим медиатором при активации IFN-индуцируемого апоптоза типа I. Более важно то, что дефекты в экспрессии или ядерной локализации STAT2 могли снижать эффективность иммунотерапии с применением интерферона I типа (Romero-

Weaver et al., 2010). Более низкие уровни экспрессии STAT2 были обнаружены при астроцитомах низкой степени злокачественности при сравнении с астроцитомами высокой степени злокачественности. Результаты показали существование взаимосвязи между STAT и сигнальным путем с участием PPAR γ при глиальных опухолях и дали дальнейшее подтверждение ожидавшейся важной роли STAT при регулировании роста и дифференциации этих опухолей (Ehrmann et al., 2008).

Транскрипционный комплекс CCR4-NOT, субъединица 1 (CNOT1)

Комплекс человеческой CCR4-NOT-деаденилазы состоит, по меньшей мере, из девяти ферментных и неферментных субъединиц. CNOT1 играет важную роль при проявлении ферментативной активности комплекса CCR4-NOT и поэтому особенно важен при контроле деаденирования мРНК и распада мРНК. Истощение CNOT1 структурно и функционально разрушает комплекс CCR4-NOT и индуцирует стабилизацию мРНК, что приводит к увеличению трансляции, вызывая апоптоз ЭР, опосредованный стрессом. Ito и соавт. пришли к заключению, что CNOT1 способствует жизнеспособности клетки, предохраняя активность деаденилазы CCR4-NOT (Ito et al., 2011). мРНК-опосредованное истощение эндогенного CNOT1 или других субъединиц Ccr4-Not в раковых клетках молочной железы приводит к нарушению регуляции генов-мишеней ER α (повышенной индукции генов-мишеней ER α -TTF1 и c-Myc). Эти факты определяют функцию человеческого комплекса Ccr4-Not как транскрипционного репрессора сигнальных путей ядерных рецепторов что имеет значимость для понимания молекулярных путей, задействованных при раке (Winkler et al., 2006).

Серин гидроксиметилтрансфераза 2 (митохондриальная) (SHMT2)

Ген SHMT2 кодирует митохондриальную форму пиридоксаль-фосфат-зависимого фермента, который катализирует обратимую реакцию превращения серина и тетрагидрофолата в глицин и 5,10-метилтен тетрагидрофолат. Кодированный продукт, в первую очередь, отвечает за синтез глицина. При полигенной болезни, такой как рак легких, взаимодействия между генами, как ожидается, играют важную роль в определении фенотипической variability заболеваний. Взаимодействия между полиморфизмами MTHFR677, MTHFR1298 и SHMT могут оказывать значительное влияние на генетическую нестабильность у пациентов с раком легких. Было продемонстрировано, что в отношении цитогенных изменений лимфоциты пациентов с раком легких, подверженных воздействию табак-специфического карциногена 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанона [NNK], значительно чаще имели цитогенетические повреждения в присутствии генов MTHFR 677, MTHFR 1298 и аллельных вариантов SHMT (Piskac-Collier et

al., 2011). Фармакогеномные исследования роли полиморфизма гена SHMT в отношении эффективности терапевтических протоколов 5-FU и FOLFIRI при лечении пациентов с колоректальным раком показали наличие значительного влияния, выразившегося также в изменении общей выживаемости (Timar et al., 2006).

Jun B протоонкоген (JUNB)

JunB – это член семейства AP-1 (активаторный белок-1) димерных транскрипционных факторов. Транскрипционный фактор AP-1 задействован в клеточной пролиферации, трансформации и гибели (Shaulian and Karin, 2002). Возможно, что JunB регулируется сигнальным путем NF- κ B, а высокий уровень экспрессии JunB, индуцированной HGF, играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации и клеточной инвазии посредством экспрессии MMP-9 (Lee and Kim, 2012). JunB, вероятно, играет онкогенную роль в развитии лимфом, в частности лимфом Ходжкина (Shaulian, 2010). JunB является необходимым регулятором p16 вверх по ходу процесса и способствует сохранению механизма старения клеток, блокирующего злокачественную трансформацию TAC. Таким образом, JunB, по-видимому, играет важную роль в контроле процесса онкогенеза предстательной железы (Konishi et al., 2008). JunB способствует развитию инвазивности опухоли и усиливает ангиогенез при VHL-дефицитных видах светлоклеточного рака почки (Kanno et al., 2012).

Трансформирующий кислый белок, содержащий биспиральный домен 3 (ТАСС3)

ТАСС3 существует в комплексе с ch-TOG (ген, экспрессируемый в избытке при опухолях печени и толстой кишки) и клатрином, который перекрестно сшивает микротрубочки в волокнах кинетехора. ТАСС3 экспрессируется в некоторых пролиферативных тканях, включая семенник, легкие, селезенку, костный мозг, вилочковую железу и лейкоциты периферической крови. Экспрессия ТАСС3 изменена в некоторых видах опухолей человека. В клетках ТАСС3 локализован как на centrosомах, так и микротрубочках веретена деления, но не на астральных микротрубочках (Hood and Royle, 2011). Экспрессия ТАСС3 коррелировала с экспрессией p53, и пациенты, чьи опухоли в высокой степени экспрессировали ТАСС3 и p53, имели значительно худший прогноз, чем пациенты, чьи опухоли имели низкий уровень экспрессии в обоих опытах по иммуноокрашиванию ($P = 0,006$). Предполагается, что повышение уровня ТАСС3 может обеспечивать пролиферативное преимущество для НМРЛ и способствовать прогрессированию опухоли, и что экспрессия ТАСС3 является сильным прогностическим индикатором клинического исхода при НМРЛ (Jung et al., 2006). Тасс3 может быть негативным регулятором сигнального пути Notch (Bargo et al., 2010).

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

RAD54B, белок репарации и рекомбинации ДНК, у людей кодируется геном RAD54B. Связываясь с двухнитевой ДНК, RAD54 проявляет АТФазную активность в присутствии ДНК. Человеческий белок RAD54B является паралогом белка RAD54, который играет важные роли в гомологичной рекомбинации. Гомологичная рекомбинация (ГР) необходима для правильной репарации двухнитевых разрывов в ДНК (DSB) (Sarai et al., 2008). Нокдаун гена RAD54B, о котором известно, что он имеет соматические мутации при раке, вызывает хромосомную нестабильность (CIN) в клетках млекопитающих (McManus et al., 2009). Повышенная экспрессия гена RAD54B значимо ассоциирована с более кратким периодом времени до начала прогрессирования заболевания и плохой общей выживаемостью у пациентов с глиобластомой (Grunda et al., 2010).

Эукариотический фактор элонгации трансляции 2 (EEF2)

EEF2 кодирует члена семейства GTP-связывающих факторов элонгации трансляции. Этот белок является необходимым фактором для синтеза белков. Он способствует GTP-зависимой транслокации формирующейся белковой цепи из А-участка в Р-участок рибосомы. EEF2 был экспрессирован на высоком уровне в клетках аденокарциномы легкого (АДЛ), но не в прилегающей, не пораженной опухолью ткани. Предполагается, что eEF2 является антиапоптотическим маркером при АДЛ, поскольку у пациентов с высоким уровнем экспрессии eEF2 частота возникновения раннего рецидива была существенно выше, и прогноз был значительно хуже. Подавление экспрессии eEF2 повышало митохондриальную элонгацию, клеточную аутофагию и чувствительность к цисплатину. Более того, eEF2 был СУМОилирован в клетках АДЛ, и СУМОилирование eEF2 коррелировало с медикаментозной резистентностью (Chen et al., 2011a). EEF2 является привлекательной мишенью в рамках противораковой терапии, поскольку ингибирование EEF2 приводит к быстрой блокировке белкового синтеза, вызывая апоптоз и приводя, в конечном итоге, к гибели клетки. Результатом миРНК-индуцированного сайленсинга EEF2 была специфическая цитотоксичность для опухолевых клеток (Chen et al., 2011b; Wullner et al., 2008).

Циклин А2 (CCNA2)

CCNA2 принадлежит к семейству высоко консервативных циклинов. Циклины выполняют функцию регуляторов CDK (циклинзависимые киназы). Различным циклинам свойственна

разная экспрессия и способы деградации, которые содействуют временной координации каждого этапа митоза (Deshpande et al., 2005). Человеческий циклин A2 представляет собой ключевой регулятор прохождения через S-фазу и входа в митоз. CCNA2 связывает и активирует киназы CDC2 или CDK2, и, таким образом, способствует переходам как от G1 фазы клеточного цикла к S, так и от G2 к M (Honda et al., 2012). Мутации, амплификации и избыточная экспрессия этого гена, который изменяет ход клеточного цикла, часто наблюдались в различных опухолях и могут благоприятствовать онкогенезу (Cooper et al., 2009; Kars et al., 2011; Kim et al., 2011; Tompkins et al., 2011). Кроме того, было описано, что экспрессия CCNA2 ассоциирована с плохим прогнозом при нескольких видах рака (Yasmeen et al., 2003), и что повышенная экспрессия циклина A коррелирует с более короткой продолжительностью жизни (Dobashi et al., 1998).

Трансформирующий нейрэпителиальные клетки белок 1 (NET1) 41

NET1 является частью семейства Rho факторов обмена гуанин-нуклеотидов. Члены этого семейства активируют белки Rho, катализируя замену ГДФ на ГТФ. Белок, кодируемый NET1, взаимодействует с RhoA внутри клеточного ядра и может играть роль в репарации поврежденных ДНК после ионизирующего излучения.

Ген NET1, но не опиоидные рецепторы, экспрессируется в клетках аденокарциномы молочной железы и может способствовать их миграции (Esimovic et al., 2011). Высокая экспрессия NET1 наблюдается в ткани рака желудка (РЖ) и стимулирует инвазивный фенотип этого заболевания (Srougi and Burrige, 2011). NET1 играет важную роль в миграции и инвазии клеток РЖ, ключевых аспектах для прогрессирования РЖ (Bennett et al., 2011). Более высокий уровень экспрессии генов RhoC и NET1 в клетках рака предстательной железы человека после кратковременной эндокринной терапии позволяет предположить, что RhoC и NET1 могут стать терапевтическими мишенями во время эндокринной терапии (Kawata et al., 2012).

Открытая рамка считывания 24 хромосомы 11 (C12orf44)

Ген C11orf24 был идентифицирован Twells и соавт. (2001). Ген C11orf24 не имеет известного сходства с другими генами, и его функция неизвестна. Анализ методом Northern blot обнаружил высокий уровень экспрессии транскрипта размером 1,9-кб в сердце, плаценте, печени, поджелудочной железе и толстом кишечнике. Низкие уровни были обнаружены в головном мозге, легких, скелетных мышцах, почках, селезенке, предстательной железе, семеннике, яичнике и тонком кишечнике, а очень низкие уровни были установлены в вилочковой железе и

лейкоцитах (Twells et al., 2001). Белок C11orf24 длиной в 449 аминокислот локализован на участке хромосомы 11q13. Этот участок описывается как участок предрасположенности ко многим видам рака (Gudmundsson et al., 2009; Purdue et al., 2011).

Регулятор конденсации хромосом 1 (RCC1)

Регулятор конденсации хромосом 1 (RCC1) – это фактор гуанин-нуклеотидного обмена для Ran ГТФазы. Локализованная выработка Ran-ГТФ с помощью RCC1 на хроматине наиболее важна для нуклеоцитоплазматического транспорта, сборки митотического веретена и образования ядерной оболочки (Hitakomate et al., 2010). Некоторые данные указывают на то, что связывание митотических регуляторов с хромосомами, таких как RCC1, Mad2 и сурвивина, необходимо для прохождения фазы митоза (Ho et al., 2008). Wong и соавт. установили, что уровень ядерного RanГТФ снижается на ранних стадиях апоптоза, что коррелирует с иммобилизацией RCC1 на хромосомах. Поэтому они делают предположение, что RCC1 считывает код гистона, созданный активированным каспазой Mst1, чтобы инициировать апоптоз посредством снижения уровня RanГТФ в ядре (Wong et al., 2009).

Семейство антигенов меланомы F, 1 (MAGEF1)

Наиболее известные члены надсемейства MAGE (меланома-ассоциированный антиген) имеют такой паттерн экспрессии: они экспрессируются в опухолях, семеннике и эмбриональных тканях, что было описано как раковая/тестикулярная экспрессия (подгруппа MAGE I). Пептиды подгруппы MAGE I успешно использовали в рамках вакцинации пептидами и дендритными клетками (Nestle et al., 1998; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1995; Thurner et al., 1999). Напротив, некоторые гены MAGE (MAGE подгруппа II), такие как MAGEF1, повсеместно экспрессируются в исследованных взрослых и эмбриональных тканях, а также в тканях многих видов опухолей, включая рак яичника, молочной железы, шейки матки, меланому и лейкемию (Nestle et al., 1998; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1995; Thurner et al., 1999). Тем не менее, избыточная экспрессия MAGEF1 могла быть обнаружена в клетках НМРЛ (Tsai et al., 2007) и 79 % когорты пациентов с колоректальным раком из Тайваня (Chung et al., 2010).

Не-SMC субъединица D2 комплекса конденсина I (NCAPD2)

Конденсины – это гетеропентамерные комплексы, которые первоначально были идентифицированы как структурные компоненты митотических хромосом. NCAPD2 является обязательным компонентом комплекса конденсина человека, необходимого для конденсации хромосом

в митозе. Элиминация NCAPD2 воздействует на выравнивание хромосом в метафазе и замедляет входение в анафазу (Watrin and Legagneux, 2005). Недавние исследования генетического сцепления и генетических ассоциаций рассматривали локус хромосомы 12p13 в качестве возможно несущего генетические варианты предрасположенности к болезни Альцгеймера (БА). Анализ ассоциации с одним маркером выявил два однонуклеотидных полиморфизма в NCAPD2 (rs7311174 и rs2072374), показывающих номинально значимые значения p ($p = 0,0491$ и $0,0116$, соответственно). Эти данные генетического анализа свидетельствуют о том, что локус хромосомы 12p13 ассоциирован с БА у китайцев (Li et al., 2009).

Открытая рамка считывания 44 хромосомы 12 (C12orf44)

Во время поисков ортологов Atg13-взаимодействующего белка дрозофилы в банках данных Mercer и соавт. (2009) идентифицировали человеческий ATG101, известный также как C12orf44 (Mercer et al., 2009). Ген ATG101 был картирован на хромосоме 12q13.13. Как было предсказано для белка, в котором прослежено 218 аминокислот, он должен быть цитозольным гидрофильным белком (Hosokawa et al., 2009). Макроаутофагия – это катаболический процесс при опосредованной лизосомами деградации цитоплазматических белков, органелл и макромолекул. Белки ATG, такие как ATG101, требуются для формирования аутофагосом, двухмембранных везикул, которые окружают и изолируют цитоплазматический «груз» до слияния с лизосомами. ATG101 (C12orf44) необходим для аутофагии (Mercer et al., 2009).

Е3-убиквитин-протеин-лигаза 4, содержащая домены HECT и RLD (HERC4)

HERC4 принадлежит к семейству HERC убиквитин-лигаз, все их которых содержат домен HECT и, по меньшей мере, 1 RCC1 (MIM 179710)-подобный домен (RLD). Состоящий из 350 аминокислот домен HECT, как предсказано, катализирует образование тиоэфира с убиквитином до его переноса к субстрату. Для RLD предсказано, что он выполняет функцию фактора обмена гуанин-нуклеотидов для малых G-белков (Hochrainer et al., 2005). Несмотря на повсеместную экспрессию во всех тканях, Е3-убиквитин-лигаза Herc4 наиболее высоко экспрессирована в семеннике, в частности во время сперматогенеза. Лигаза Herc4 необходима для надлежащего созревания и удаления цитоплазматических капелек в целях обеспечения полной функциональности сперматозоидов (Rodriguez and Stewart, 2007).

Ген белка, связывающего мРНК инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2BP3)

IGF2BP3 является членом белкового семейства инсулиноподобных факторов роста II, связывающих мРНК, вовлеченным в локализацию, оборот и трансляционный контроль мРНК. Этот

белок содержит несколько КН-доменов (К-гомологичных), которые важны в связывании РНК, и о которых известно, что они вовлечены в синтез и метаболизм РНК. Экспрессия проявляется, главным образом, во время эмбрионального развития и была описана для некоторых опухолей. Таким образом, IGF2BP3 рассматривается как онкофетальный белок (Liao et al., 2005). IGF2BP3 может способствовать пролиферации опухолевых клеток, усиливая синтез белка IGF-II и индуцируя клеточную адгезию и инвазию за счет стабилизации CD44 мРНК (Findeis-Hosey and Xu, 2012). Более того, экспрессия IGF2BP3 исследовалась при многочисленных неоплазиях человека с возрастающей очевидностью, что она опосредует миграцию, инвазию, клеточную выживаемость и распространение метастазов (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), она также может быть причастна к ангиогенезу (Suvasini et al., 2011; Chen et al., 2012). При аденокарциноме легкого более высокая частота экспрессии IGF2BP3 может быть обнаружена в умеренно или плохо дифференцированных аденокарциномах, что может быть ассоциировано с агрессивным биологическим поведением (Findeis-Hosey et al., 2010; Beljan et al., 2012; Findeis-Hosey and Xu, 2012).

Гомолог 6 цикла клеточного деления (*S. cerevisiae*) (CDC6)

Белок CDC6 выполняет функцию регулятора на ранних этапах репликации ДНК. Он находится в клеточном ядре во время фазы G1 клеточного цикла, но перемещается в цитоплазму в начале фазы S. Кроме того, предполагается, что в эукариотических клетках высших организмов CDC6 регулирует активацию репликации в сверхочной точке за счет взаимодействия с ATR (Yoshida et al., 2010). CDC6 необходим для репликации ДНК и нарушение его регуляции играет роль в онкогенезе. Было обнаружено, что снижение экспрессии CDC6 с помощью РНК-интерференции (RNAi) предотвращало клеточную пролиферацию и стимулировало апоптоз (Lau et al., 2006). Избыточная экспрессия CDC6 была обнаружена при нескольких видах рака. К видам рака, при которых в избытке экспрессируется CDC6, относятся рак желудка (Tsukamoto et al., 2008), опухоли головного мозга (Ohta et al., 2001), плоскоклеточная карцинома полости рта (Feng et al., 2008), карцинома шейки матки (Wang et al., 2009b) и злокачественная мезотелиома (Romagnoli et al., 2009).

Белок активации фибробластов, альфа (FAP)

Белок активации фибробластов (FAP) – это интегральный мембранный гликопротеин типа II, принадлежащий к семейству сериновых протеаз. Предполагаемая активность сериновой протеазы FAP-альфа и ее характер индукции *in vivo* могут указывать на роль этой молекулы в

контроле роста фибробластов или эпителиально-мезенхимального взаимодействия во время развития, репарации тканей и эпителиального онкогенеза (Scanlan et al., 1994). Большинство взрослых тканей и доброкачественных эпителиальных опухолей демонстрируют невысокую или не поддающуюся измерению экспрессию FAP. Тем не менее, экспрессия FAP обнаруживается в стромальных клетках свыше 90% злокачественных опухолей молочной железы, толстой и прямой кишки, легких, кожи и поджелудочной железы, фибробластах при заживлении ран, сарком мягких тканей и некоторых мезенхимальных клетках эмбрионального происхождения. FAP играет важную роль в росте опухоли и развитии метастазов посредством клеточной адгезии и миграционных процессов, в равной степени как и быстрой деградации компонентов внеклеточного матрикса (ECM). Таким образом, он присутствует на опухолевых клетках, поражающих ECM, и эндотелиальных клетках, задействованных в ангиогенезе, но не в неактивных клетках того же типа (Dolznic et al., 2005; Kennedy et al., 2009; Rettig et al., 1993; Rettig et al., 1994; Scanlan et al., 1994; Zhang et al., 2010a).

Семейство сигнальных белков типа Wingless вирусов MMTV, имеющих интеграционные сайты, член 5A (WNT5A)

В целом, Wnt5a регулирует спектр различных клеточных функций, таких как пролиферация, дифференциация, миграция, адгезия и полярность (Kikuchi et al., 2012). Он экспрессирован в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках человека (Katoh, 2008). WNT5A классифицируется как нетрансформирующий член семейства WNT, чья роль при онкогенезе все еще неоднозначна. Он проявляет активность белка-супрессора опухоли при некоторых видах рака (щитовидная железа, головной мозг, молочная железа и толстая и прямая кишка), но его экспрессия aberrантно повышена при раке легких, желудка и предстательной железы (Li et al., 2010). Онкогенный белок WNT5A активирует канонический сигнальный путь WNT в стволовых раковых клетках для самообновления, а неканонический сигнальный путь WNT – в месте контакта опухоли и стромы для инвазии и метастазирования (Katoh and Katoh, 2007). Экспрессия WNT5A была описана для различных видов опухолей. Например, аномальная экспрессия белка Wnt5a наблюдалась в 28% образцов рака предстательной железы, где он способствует развитию агрессивной формы (Yamamoto et al., 2010). Более того, как было описано, избыточная экспрессия WNT5A ассоциируется с плохим прогнозом и/или повышением степени злокачественности опухоли при раке яичника (Badiglian et al., 2009), меланоме (Da Forno et al., 2008; Weeraratna et al., 2002), глиобластоме (Yu et al., 2007), раке легких (Huang et al., 2005) и раке поджелудочной железы (Ripka et al., 2007). При гепато-клеточной карциноме, по-

видимому, канонический сигнальный путь Wnt содействует образованию опухоли, а неканонический сигнальный путь – прогрессированию опухоли (Yuzugullu et al., 2009).

TPX2, ассоциированный с микротрубочками гомолог (*Xenopus laevis*) (TPX2)

TPX2 – это фактор сборки веретена деления. Он необходим для нормальной сборки митотических веретен и микротрубочек во время апоптоза. TPX2 необходим для хроматин и/или кинетохор-зависимой нуклеации микротрубочек (Bird and Human, 2008; Moss et al., 2009). Вновь синтезированный TPX2 необходим на протяжении практически всего процесса активации киназы Аутога А и всего процесса синтеза и фосфорилирования p53 *in vivo* во время созревания ооцитов (Pascreau et al., 2009). TPX2 – это белок, ассоциированный с клеточным циклом, который экспрессируется в избытке клетками многих видов опухолей, таких как менингиомы (Stuart et al., 2010), плоскоклеточная карцинома гортани (SCCL) (Cordes et al., 2010), плоскоклеточные карциномы полости рта (SCC) (Shigeishi et al., 2009), гепатоклеточные карциномы (ГКК) (Satow et al., 2010), опухоль поджелудочной железы (Warner et al., 2009), рак яичника (Ramakrishna et al., 2010), плоскоклеточная карцинома легких (Lin et al., 2006; Ma et al., 2006). Он часто экспрессируется в избытке совместно с Аутога-А, приводя к зарождению новой функциональной единицы с онкогенными свойствами (Asteriti et al., 2010). Экспрессия TPX2 является прогностическим индикатором при раке легких (Kadara et al., 2009).

Рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности (RHAMM) (HMMR)

Рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности RHAMM (HMMR) выполняет различные функции в клетке, а также на клеточной мембране. RHAMM может экспортироваться на клеточную поверхность, где он связывается с гиалуроновой кислотой (НА) и взаимодействует с НА-рецептором CD44. RHAMM модулирует такие процессы, как клеточная подвижность, заживление ран и инвазия (Sohr and Engeland, 2008). RHAMM (рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности) является одним из рецепторов гиалуронана (HYA) (Gares and Pilarski, 2000). Раковые клетки также экспрессируют маркеры адгезии (CD44, RHAMM и т. д.) для HYA, и HYA защищает раковые клетки от атаки иммунной системы. Уровень HYA в сыворотке часто повышен у пациентов, имеющих метастазы (Delpech et al., 1997). Кроме того, было высказано предположение, что взаимодействие HYA с RHAMM (HMMR) и CD44 на раковых клетках может иметь важное значение для стимуляции прогрессирования опухоли и диссеминации (Li et al., 2000b). Кроме того, RHAMM экспрессируется в избытке в нескольких раковых тканях (Tzankov et al., 2011); (Kramer et al., 2010); (Twarock et al., 2010); (Shigeishi et al., 2009); (Zlobec et al., 2008); (Li et al., 2000a)).

Домен 8 металлопептидазы ADAM (ADAM8)

ADAM8 является членом семейства ADAM (домен дезинтегрина и металлопротеиназы). Многие виды ADAM, включая ADAM8, экспрессируют клетки злокачественных опухолей человека, в которых они участвуют в регуляции активности фактора роста и функций интегрина, способствуя росту и инвазии клеток (Mochizuki and Okada, 2007). Экспрессия ADAM8 имела положительную корреляцию с EGFR. Оба белка были главным образом экспрессированы в цитоплазме и на клеточной мембране (Wu et al., 2008). ADAM8 был экспрессирован в избытке в подавляющем большинстве исследованных проб рака легких. Экзогенная экспрессия ADAM8 повышала миграционную активность клеток млекопитающих, указывая на то, что ADAM8 может играть значительную роль в прогрессировании рака легких (Ishikawa et al., 2004). [Повышенная экспрессия] ADAM8 ассоциировалась с плохим прогнозом при раке легких (Hernandez et al., 2010). Избыточная экспрессия ADAM8 была ассоциирована с более коротким периодом выживаемости пациента и была хорошим прогностическим фактором отдаленных метастазов при ПЖК (Roemer et al., 2004b; Roemer et al., 2004a). Кроме того, уровни экспрессии и протеазная активность ADAM8 коррелировали с инвазивностью клеток глиомы, указывая на возможную значительную роль ADAM8 в опухолевой инвазии при раке головного мозга (Wildeboer et al., 2006).

Коллаген альфа-3(VI) цепочечный белок (COL6A3)

Ген COL6A3 кодирует цепь альфа-3, одну из трех альфа-цепей коллагена типа VI. Как было продемонстрировано, белковые домены связываются с белками внеклеточного матрикса, что представляет собой взаимодействие, объясняющее значимость этого коллагена в организации компонентов матрикса.

Ремоделирование внеклеточного матрикса посредством избыточной экспрессии коллагена типа VI вносит свой вклад в приобретение клетками рака яичника резистентности к цисплатину. Присутствие коллагена типа VI соотносилось со степенью злокачественности опухоли, он являлся прогностическим фактором для рака яичника (Sherman-Baust et al., 2003). COL6A3 экспрессируется в избытке в клетках колоректальных опухолей (Smith et al., 2009a), карцином слюнной железы (Leivo et al., 2005) и экспрессируется в различной степени в тканях рака желудка (Yang et al., 2007). COL6A3 был идентифицирован в качестве одного из семи генов с опухолеспецифическими вариантами сплайсинга. Оцененные опухолеспецифические изменения в сплайсинге были высоко согласованными, позволяя сделать четкое подразделение на

нормальные и раковые образцы, в некоторых случаях даже на различные стадии опухолей (Thorsen et al., 2008).

Thy-1 поверхностный клеточный антиген (THY1)

Thy-1 (CD90) является заякоренным на гликозилфосфатидилинозитоле (GPI) гликопротеином массой 25-37 кДа, экспрессируемым во многих видах клеток, включая Т-клетки, тимоциты, нейроны, клетки эндотелия и фибробласты. Активация Thy-1 может способствовать активации Т-клеток. Thy-1 влияет также на многочисленные неиммунологические биологические процессы, включая клеточную адгезию, отрастание аксонов, рост опухоли, супрессию опухоли, миграцию, заживление ран и клеточную смерть. Thy-1 является важным регулятором межклеточных взаимодействий и взаимодействий между клетками и матриксом, при этом играя важные роли в регенерации нервов, метастазировании, воспалительных процессах и фиброзе (Rege and Hagood, 2006b; Rege and Hagood, 2006a). Кроме того, Thy-1, по-видимому, является маркером ангиогенеза у взрослых, но не на эмбриональной стадии. Повышение уровня Thy-1 под действием цитокинов, но не факторов роста, указывает на важность воспалительного процесса в патогенезе ангиогенеза у взрослых (Lee et al., 1998). Установлена значительная избыточная экспрессия Thy-1, локализованного в ядрах клеток рака легкого, по сравнению с нормальной тканью или доброкачественными опухолевыми клетками легкого, и это один из факторов, соотносимых с прогнозом для пациентов с НМРЛ. Таким образом, Thy-1 может быть новым маркером злокачественности в латентный период в патологии рака легкого (Chen et al., 2005b). Thy-1 может быть рассмотрен как суррогатный маркер для различных видов стволовых клеток (мезенхимных стволовых клеток, стволовых клеток печени («овальных клеток»)) (Masson et al., 2006), стволовых клеток кератиноцитов (Nakamura et al., 2006) и кроветворных стволовых клеток (Yamazaki et al., 2009).

Йодтиронин-дейодиназа, типа II (DIO2)

Белок, кодируемый геном DIO2, принадлежит к семейству йодтиронин-дейодиназ. Он в высокой степени экспрессируется клетками щитовидной железы и может вносить значительный вклад в относительное повышение выработки Т3 щитовидной железой у пациентов с базедовой болезнью и аденомами щитовидной железы (Meyer et al., 2008); (de Souza Meyer et al., 2005)). При назофарингеальной карциноме (NPC) паттерны экспрессии генов существенно различаются между типами распространения заболевания, вверх или вниз. Экспрессия гена DIO2 выше при распространении опухоли вниз (вниз = дистантные метастазы), чем при рас-

пространении вверх (местный рост и инвазия основания черепа), что может быть тесно взаимосвязано с метастатическим потенциалом NPC (Liang et al., 2008). мРНК DIO2, а также собственно DIO2, экспрессируются клетками опухолей головного мозга (Murakami et al., 2000). Активность гена D2 присутствует в легких, и ее уровень сходен в тканях периферического и центрального рака легкого (Wawrzynska et al., 2003).

Периостин, остеобласт-специфический фактор (POSTN)

POSTN, ген, кодирующий белок со сходством с семейством фасциклинов и задействованный в процессах, связанных с выживаемостью клеток, и ангиогенезе, стал многообещающим маркером прогрессии опухоли при различных видах рака человека (Ruan et al., 2009).

Высокий уровень экспрессии белка периостина или мРНК был обнаружен в большинстве солидных опухолей, включая карциному молочной железы (Zhang et al., 2010b), толстой кишки (Kikuchi et al., 2008), головы и шеи (Kudo et al., 2006), поджелудочной железы (Kanno et al., 2008), папиллярную карциному щитовидной железы (Puppini et al., 2008), предстательной железы (Tischler et al., 2010), яичника (Choi et al., 2010), легкого (Takanami et al., 2008) и печени (Utispan et al., 2010), а также плоскоклеточную карциному пищевода (Kwon et al., 2009). На аномально высоком уровне периостатин экспрессируют клетки рака легкого, что коррелирует с ангиогенезом, инвазией и метастазированием (Takanami et al., 2008). Сайленсинг периостатина в клетках немелкоклеточного рака легкого (НМПЛ) A549 ингибирует рост опухолевых клеток и уменьшает клеточную инвазию (Wu et al., 2013).

SLIT1 (гомолог slit 1 (дрозофила)), SLIT2 (гомолог slit 2 (дрозофила))

Белки SLIT (SLIT1, SLIT2 и SLIT3) являются семейством секретруемых белков, которые опосредуют позиционные взаимодействия между клетками и их окружением во время развития за счет сигнальных реакций с участием рецепторов ROBO (Hinck, 2004). Сигнальные пути SLIT/ROBO, тем не менее, не ограничены процессом развития, и потеря этих стимулов, скорее всего, играет важную роль во время прогрессирования опухоли. Slits и Robos рассматриваются в качестве кандидатов в гены-супрессоры опухолей, поскольку их промоторы часто гиперметилированы при раке эпителия (Narayan et al., 2006; Schmid et al., 2007; Latil et al., 2003). Приблизительно в 50% образцов опухолей молочной железы человека экспрессия генов SLIT2 или SLIT3 подавлена (Sharma et al., 2007). Избыточное метилирование SLIT2 часто обнаруживалось при НМПЛ и ассоциировалось с различными клиническими показателями (Suzuki et al., 2013).

TLX3 (гомеобокс 3 Т-клеточной лейкемии)

TLX3 (также известный под названием RNX или HOX11L2) принадлежит к семейству гомеобокс-содержащих генов-сирот, которые кодируют связывающиеся с ДНК ядерные транскрипционные факторы. Члены семейства генов HOX11 характеризуются замещением цитозина на треонин-47 в высококонсервативном гомеодомене (Dear et al., 1993). TLX3 экспрессируется исключительно в развивающемся продолговатом мозге и необходим для правильного формирования релейных висцеральных сенсорных нейронов первого порядка и большинства из (нор-) адренергических центров мозгового ствола, в особенности задействованных в физиологических процессах контроля сердечно-сосудистой и дыхательной систем (Qian et al., 2001). Экспрессия TLX3 была также обнаружена в образцах клеток лейкемии у 20% детей и 13% взрослых, страдающих острой Т-клеточной лимфоцитарной лейкемией (Cave et al., 2004), хотя этот ген никогда не участвовал в дифференциации нормальных Т-клеток (Ferrando et al., 2004).

CEP192 (центросомный белок 192 кДа)

Центросомы играют важную роль в различных клеточных процессах, включая образование веретена деления и сегрегацию хромосом. CEP192 – это центросомный белок, который играет основную роль в биогенезе и функционировании центросом у млекопитающих, дрозофилы и *C. elegans* (Gomez-Ferreria et al., 2012). Он стимулирует образование скелета, при котором образуется кольцевой комплекс гамма-тубулина, и другие белки, задействованные в нуклеации микротрубочек и сборке веретена деления, становятся функциональными во время митоза (Gomez-Ferreria et al., 2007).

ANKS1A (белок 1А, содержащий анкириновый повтор и домен стерильного альфа-мотива)

Белок 1А, содержащий анкириновый повтор и SAM-домен – это белок, который у человека кодируется геном ANKS1A (Nagase et al., 1996). Впервые ген ANKS1A был описан в качестве мишени и преобразователя сигнала рецепторных тирозинкиназ, таких как EGFR и PDGFR (Pandey et al., 2002) и совсем недавно в качестве партнера по взаимодействию с рецепторной тирозинкиназой EphA8 (Shin et al., 2007). В недавнем исследовании однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) были генотипированы у 348 пациентов с НМПЛ поздних стадий. Было идентифицировано 17 наиболее предпочтительных кандидатов SNP, связанных с прогнозом. SNP были локализованы на участке геномной ДНК гена ANKS1A (Lee et al., 2013).

CEP250 (центросомный белок 250 кДа)

Ген CEP250 кодирует центральный центросомный белок, необходимый для удвоения centrioles во время интерфазы клеточного цикла (Mayor et al., 2002). Во время анализа радиационных гибридов Fgu и соавт. (1998) картировали ген CEP250 на центромерном участке хромосомы 20, приблизительно в 20q11.2 (Fry et al., 1998). Mayor и соавт. (2002) установили, что избыточная экспрессия CEP250 в клеточных линиях остеосаркомы человека приводила к образованию крупных, ассоциированных с центросомой, структур. Гиперэкспрессия CEP250 не препятствует разделению центросомы или делению клеток, тем не менее, указывая на то, что CEP250 отделяется от центросом под воздействием активности, регулируемой клеточным циклом (Mayor et al., 2002).

MDN1 (MDN1, гомолог мидазина (дрожжи))

MDN1 гомолог мидазина (дрожжи) является белком, кодируемым у человека геном MDN1. Ген мидазин представлен единственной копией, он кодирует весьма консервативный белок длиной приблизительно 600 кДа у всех эукариот, для которых имеется информация. У человека ген картирован на хромосоме 6q15 и кодирует предсказанный белок с 5596 остатками (632 кДа) (Garbarino and Gibbons, 2002). Недавно было обнаружено, что MDN1 мутирует в клетках рака молочной железы люминального подтипа В. MDN1 может играть роль в развитии и гормональной резистентности этого агрессивного подтипа (Cornen et al., 2014).

OLFM1 (ольфактомедин 1)

OLFM1, называемый также Noelin-1 – секретируемый гликопротеин, принадлежащий к семейству белков, содержащих ольфактомедин-подобный домен, играющий важную роль в регуляции выработки клеток нервного гребня нервной трубкой (Varembaum et al., 2000). Первоначально ольфактомедин был идентифицирован как основной компонент слизистого слоя, который окружает хемосенсорные дендриты ольфакторных нейронов (Kulkarni et al., 2000). Экспрессия белка ольфактомедина 1 была значительно выше в клетках аденокарциномы легкого, чем рака легкого других гистологических типов и нормальных тканях легкого (Wu et al., 2010). Кроме того, регуляция OLFM1 была нарушена при эндометрическом раке, саркоме Юинга и нейробластоме (Wong et al., 2007; Allander et al., 2002; Khan et al., 2001).

VUB1B (фактор почкования, неингибируемый гомологом бензимидазола 1 бета (дрожжи))

BUB1B, называемый также BubR1, является центральным компонентом митотической сверочной точки, который связывается с и ингибирует Cdc20-активируемый комплекс, стимулирующий анафазу (APC/CCdc20), убиквитин E3-лигазой, которая инициирует анафазу, управляя опосредованным сепаразой расщеплением когезиновых колец, соединяющих сестринские хроматиды (Baker et al., 2004). BubR1 способствует правильному расхождению хромосом не только за счет активации митотической сверочной точки, но и также путем регуляции присоединения хромосом к нитям веретена деления (Malureanu et al., 2009; Lampson and Karoor, 2005). Нарушение функции сверочной точки веретена деления было обнаружено во многих формах рака. Мутации гена BubR1 ассоциировались с мозаичной смешанной анеуплоидией (MVA), редким синдромом, встречающимся у человека и характеризующимся анеуплоидизацией, предрасположенностью к опухолевым заболеваниям и несколькими прогероидными чертами, включая короткую продолжительность жизни, замедление роста и умственного развития, катаракту и лицевой дисморфизм (Matsuura et al., 2006).

PI4KA (каталитическая субъединица альфа фосфатидилинозитол-4-киназы)

Человеческие клетки экспрессируют четыре различные фосфатидилинозитол 4-киназы (PI4K). Эти изоферменты (PI4KA, PI4KB, PI4K2A и PI4K2B) катализируют фосфорилирование фосфатидилинозитола (PtdIns) на цитоплазматической поверхности клеточных мембран, вызывая выработку фосфатидилинозитол-4-фосфата (PtdIns4P) (Minogue and Waugh, 2012). PI4KA обнаруживается, в основном, на эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). В его функции, по-видимому, входит регулирование как формирования E-сайтов ЭР (Blumental-Perry et al., 2006), так и концентрирования PtdIns4P в плазматической мембране (Balla et al., 2008). Группа исследователей обнаружила повышенный уровень мРНК PI4KA в клетках ГМК по сравнению со здоровыми тканями. Это повышение уровня значимо коррелировало как с плохой дифференциацией, так и скоростью активной пролиферации клеток ГМК. Следовательно, PI4KA мог бы использоваться в качестве нового молекулярного маркера для улучшения существующих прогностических моделей для ГМК (Iboudo et al., 2014).

AURKB (киназа Aurora B)

Киназа Aurora B – это белок, который участвует в присоединении митотического веретена к центромерам (Kim et al., 2011). AURKB локализована в микротрубочках рядом с кинетохорами (Kunitoku et al., 2003). Различные опухолевые клеточные линии экспрессируют в избытке киназы типа Aurora, позволяя предположить, что эти киназы могут играть роль в онкогенезе, и они уже стали потенциальными мишенями при диагностике и лечении рака (Fu et al., 2007).

Недавно был идентифицирован профиль экспрессии пяти генов (TOP2A, AURKB, BRRN1, CDK1 и FUS), которые тесно ассоциированы с исходами заболевания у пациентов с НМРЛ. Эти результаты позволяют предположить, что гены, задействованные в конденсации хромосом, такие как AURKB, скорее всего, связаны с клетками, подобными по свойствам стволовым клеткам, и могут предсказывать выживаемость при аденокарциноме легкого (Pegumal et al., 2012).

SLC3A2 (семейство транспортера растворенных веществ 3 (активаторы транспорта двухосновных и нейтральных аминокислот), член 2)

SLC3A2 включает легкую субъединицу транспортера крупных нейтральных аминокислот (LAT1), известного также под названием CD98 (кластер дифференциации 98) (Lemaitre et al., 2005). Гетеродимер CD98 состоит из тяжелой цепи II типа однопроходного трансмембранного белка (CD98hc, известной также как антигенная тяжелая цепь 4F2 или FRP-1; кодируется генами SLC3A2 и Slc3a2 человека и мыши, соответственно) размером ~80–85 кДа, которая имеет дисульфидную связь с многопроходной легкой цепью ~40 кДа (Deves and Boyd, 2000). CD98hc выполняет свои функции в стимуляции сигнальных путей, запускаемых интегринами, и в транспорте аминокислот; обе функции могут благоприятствовать выживаемости и пролиферации клетки (Cantor and Ginsberg, 2012). Многие опухоли экспрессируют CD98hc (SLC3A2), и его экспрессия коррелирует с плохим прогнозом при В-клеточных лимфомах. Кроме того, практически все исследования, в которых изучалась экспрессия CD98hc или легких цепей CD98 в клетках солидных опухолей, показали, что их экспрессия коррелировала с прогрессирующими или метастатическими опухолями (Kaira et al., 2009).

IFT81 (интрафлагеллярный транспорт 81 гомолог (*Chlamydomonas*))

Интрафлагеллярный транспорт (IFT) реснитчатых клеток-предшественников, таких как тубулина из цитоплазмы к кончикам ресничек, задействован в образовании ресничек, волосовидных органелл, имеющих в большинстве эукариотических клеток. Нокдаун IFT81 и эксперименты по спасению с точечными мутантами показали, что тубулин, связываемый IFT81, был необходим для цилиогенеза в клетках человека (Bhogaraju et al., 2013). IFT81 вместе с IFT74/72 образуют центральный комплекс для образования частиц IFT, которые необходимы для формирования ресничек (Lucker et al., 2005).

COG4 (компонент олигомерного комплекса Гольджи 4)

Комплекс COG состоит из восьми субъединиц под названием COG1–8 (Ungar et al., 2002; Whyte and Munro, 2001) и сгруппированных в два субкомплекса: COG1–4 (доля А) и COG5–8 (доля В) (Ungar et al., 2005). Комплекс COG выполняет функцию привязывания везикул, ретроградно перемещающих резидентные белки аппарата Гольджи (такие как ферменты гликозилирования) (Pokrovskaya et al., 2011). Ген COG4 картирован на хромосоме 16q22.1 (Reynders et al., 2009). Ungar и соавт. (2002) пришли к заключению, что COG4 особенно важен для сохранения структуры и выполнения функций аппарата Гольджи, и что он может влиять на транспорт через внутриклеточные мембраны (Ungar et al., 2002).

NCBP1 (ядерный кэп-связывающий белок, субъединица 1, 80 кДа)

Ядерный кэп-связывающий белок – это РНК-связывающий белок, который связывается с 5'-кэп РНК-полимеразы II. Kataoka и соавт. (1994) описали клонирование гена, который кодирует ядерный кэп-связывающий белок (NCBP1) 80-кД, обнаруженный в ядерных экстрактах клеточной линии HeLa, который может быть задействован в сплайсинге мРНК и экспорте РНК (Kataoka et al., 1994). Путем гибридизации геномной ДНК из панели гибридов соматических клеток, Chadwick et al. (1996) картировали ген NCBP1 в локусе 9q34.1 (Chadwick et al., 1996).

NEFH (нейрофиламент, тяжелый полипептид)

NEFH, кодирующий тяжелую цепь нейрофиламента, является одним из основных компонентов нейрофиламентов нейронального цитоскелета. Ген, кодирующий тяжелый полипептид нейрофиламента (NEFH, 200 кД), находится на полосе хромосомы 22q12.2 и был предложен в качестве ДНК-маркера для предсимптоматического диагноза в семьях нейрофиброматоза типа 2 (NF2). О низких уровнях экспрессии NEFH или ее отсутствии сообщалось, в основном, при опухолях вегетативной нервной системы или центральных нейроцитомах человека (Mena et al., 2001; Segal et al., 1994). Кроме того, отсутствие или пониженные уровни экспрессии NEFH наблюдались при раке предстательной железы (Schleicher et al., 1997), светлоклеточной эпителиальной опухоли (Tanaka et al., 2000) и мелкоклеточной карциноме легкого (Bobos et al., 2006). Интересно отметить, что гиперэкспрессия NEFH разрушала структуру и повреждала функции нормальной клетки, вызывая клеточную смерть (Szebenyi et al., 2002).

Подробное описание изобретения

Все термины, используемые здесь, если не указано иное, имеют значения, данные ниже.

Понятие «пептид» в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом типично пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Пептиды предпочтительно имеют длину в 9 аминокислот, но могут быть короче – 8 аминокислот в длину, и длиннее – 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислот и в случае пептидов МНС II класса они могут иметь длину в 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

Кроме того, понятие «пептид» включает в себя соли серий аминокислотных остатков, связанных друг с другом типично пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями.

Понятие «пептид» включает понятие «олигопептид». Понятие «олигопептид» в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных один с другим типично пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина олигопептида не особенно важна для изобретения до тех пор, пока в нем сохраняются надлежащие эпитоп или эпитопы. Олигопептиды типично бывают менее чем около 30 аминокислотных остатков в длину и более чем около 15 аминокислот в длину.

Понятие «пептиды настоящего изобретения» включает пептиды, состоящие из или включающие пептид, как определено выше в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 92.

Понятие «полипептид» обозначает серии аминокислотных остатков, связанных один с другим типично пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина полипептида не особенно важна для изобретения до тех пор, пока сохраняются надлежащие эпитопы. В отличие от терминов «пептид» или «олигопептид», термин «полипептид» введён для обозначения молекул, содержащих более приблизительно 30 аминокислотных остатков.

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий такую молекулу, является «иммуногенным» (и, таким образом, «иммуногеном» в рамках настоящего изобретения), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать Т-клеточный от-

вет. Таким образом, «иммуноген» будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ. В другом аспекте иммуноген может быть пептидом, комплексом из пептида и МНС, олигопептидом и/или белком, используемым для получения специфических антител или ТКР против него.

Для Т-клеточного «эпитопа» I класса необходим короткий пептид, который связан с рецептором МНС I класса, образующим трехчленный комплекс (альфа-цепь МНС класса I, бета-2-микроглобулин и пептид), который может быть распознан Т-клеткой, несущей подходящий Т-клеточный рецептор, связывающийся с комплексом МНС/пептид с подходящей аффинностью. Пептиды, связывающиеся с молекулами МНС I класса, типично имеют длину в 8-14 аминокислот и, особенно типично, длину в 9 аминокислот.

У человека имеется три различных генетических локуса, которые кодируют молекулы МНС I класса (молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA)): HLA-A, HLA-B и HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 и HLA-B*07 являются примерами различных аллелей МНС I класса, которые могут экспрессироваться из этих локусов.

Таблица 2: Частоты экспрессии F HLA*A02 и наиболее частых серологических видов HLA-DR. Частоты экспрессии выведены из частот гаплотипа G_f среди американцев, приводимых в работе Morigi и соавт. (Morigi et al., 1997), с использованием формулы Харди-Вейнберга $F=1-(1-G_f)^2$. Комбинации A*02 с определенными аллелями HLA-DR вследствие неравномерного распределения связей могут быть обогащенными или менее частыми, чем ожидается от их индивидуальных частот выявления. Более подробная информация представлена в работе Chanock и соавт. (Chanock et al., 2004).

	Частоты экспрессии HLA*02 и серотипов HLA-DR в подгруппах североамериканского населения			
Аллель HLA	Американцы европейоидной расы	Афроамериканцы	Монголоиды	Латиноамериканцы
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%

Поэтому для терапевтических и диагностических целей крайне желателен пептид, который связывается с подходящей аффинностью с несколькими различными рецепторами HLA II класса. Пептид, связывающийся с несколькими различными молекулами HLA II класса, называется беспорядочно связывающимся пептидом.

Используемая в контексте данного описания ссылка на последовательность ДНК включает как однонитевую, так и двунитевую ДНК. Таким образом, специфическая последовательность, если в контексте не указано иное, относится к однонитевой ДНК такой последовательности, дуплексу такой последовательности с его комплементом (двунитевая ДНК) и комплементу такой последовательности. Понятие «кодирующая область» относится к тому участку гена, который в естественных или обычных условиях кодирует продукт экспрессии того гена в его естественном геномном окружении, т.е., участку, кодирующему *in vivo* нативный продукта экспрессии гена.

Кодирующая область может быть из не мутировавшего («нормального»), мутировавшего или измененного гена или может даже быть из последовательности ДНК, или же гена, целиком синтезированного в лаборатории с использованием методов, хорошо известных специалистам области синтеза ДНК.

Понятие «нуклеотидная последовательность» относится к гетерополимеру дезоксирибонуклеотидов.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая конкретный пептид, олигопептид или полипептид, может быть встречающейся в природе или может быть синтезирована. В целом, сегменты ДНК, кодирующие пептиды, полипептиды и белки данного изобретения, собраны из

фрагментов кДНК и коротких олигонуклеотидных линкеров или же из серий олигонуклеотидов для получения синтетического гена, который способен экспрессироваться в рекомбинантной транскрипционной единице, включающей регуляторные элементы, образованные из микробного или вирусного оперона.

В контексте настоящего описания понятие «нуклеотид, кодирующий пептид», относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид, включая искусственные (сделанные человеком) старт- и стоп-кодоны, совместимые с биологической системой, которой должна экспрессироваться последовательность.

Понятие «продукт экспрессии» означает полипептид или белок, являющийся природным продуктом трансляции гена любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует эквиваленты, образующиеся в результате вырождения генетического кода и, таким образом, кодирует ту/те же самую(ые) аминокислоту(ы).

Понятие «фрагмент», если относится к кодирующей последовательности, означает участок ДНК, включающий меньше, чем полную кодирующую область, продукт экспрессии которого по существу сохраняет ту же самую биологическую функцию или активность, что и продукт экспрессии полной кодирующей области.

Понятие «сегмент ДНК» относится к полимеру ДНК в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции ДНК, которая была образована из ДНК, выделенной по меньшей мере один раз в по существу чистой форме, т.е., без контаминирующих эндогенных материалов и в количестве или с концентрацией, позволяющей идентификацию, манипуляцию и восстановление сегмента и его составных нуклеотидных последовательностей стандартными биохимическими методами, например, с использованием вектора для клонирования. Такие фрагменты обеспечиваются в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними не-транслированными последовательностями или интронами, которые типично присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслированной ДНК могут присутствовать по ходу транскрипции из открытой рамки считывания, где она не интерферирует с манипуляцией или экспрессией кодирующих областей.

Понятие «праймер» означает короткую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть спарена с одной нитью ДНК с получением свободного конца 3'ОН, на котором ДНК-полимераза начинает синтезировать дезоксирибонуклеотидную цепь.

Понятие «промотор» означает участок ДНК, задействованный в связывании РНК-полимеразы для инициации транскрипции.

Понятие «выделенный» означает, что материал удален из его исходного окружения (к примеру, естественного окружения, если он встречается в природе). Например, встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, представленный в живых организмах, не является выделенным, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный от некоторых или всех сосуществующих материалов природной системы, является выделенным. Такие полинуклеотиды могли быть частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могли быть частью композиции и все-таки могли быть выделены, так что такой вектор или композиция не является частью своего естественного окружения.

Полинуклеотиды и рекомбинантные или иммуногенные полипептиды, раскрытые в соответствии с настоящим изобретением могут также быть в «очищенной» форме. Понятие «очищенный» не требует абсолютной чистоты; скорее оно предназначено для дачи относительного определения и может включать препараты с высокой очисткой или препараты только с частичной очисткой, в соответствии с тем, как эти термины понимаются специалистами соответствующей области. Например, отдельные клоны, выделенные из библиотеки кДНК, как обычно очищались до электрофоретической чистоты. Очистка исходного материала или природного материала от примесей по меньшей мере на один порядок величины, предпочтительно два или три порядка, и, более предпочтительно, четыре или пять порядков величины определено рассматривается в изобретении. Более того, определено рассматривается заявленный полипептид, чистота которого составляет, предпочтительно, 99,999% или по меньшей мере 99,99% или 99,9%; и даже желательно 99% по массе или более.

Нуклеиновые кислоты и продукты экспрессии полипептида, раскрываемые в соответствии с настоящим изобретением, в равной степени, как и векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или такие полипептиды, могут быть в «обогащенной форме». Используемый здесь термин «обогащенный» означает, что концентрация материала, по меньшей мере, приблизительно в 2, 5, 10, 100 или 1000 раз выше его естественной концентрации (например),

преимущественно 0,01 %, по массе, предпочтительно, по меньшей мере, около 0,1% по массе. Рассматриваются также обогащенные препараты с концентрацией примерно 0,5%, 1%, 5%, 10% и 20% по массе. Последовательности, конструкции, векторы, клоны и другие материалы, включенные в настоящее изобретение, могут быть предпочтительно в обогащенной форме или выделенными.

Понятие «активный фрагмент» означает фрагмент, который дает иммунный ответ (т.е. обладает иммуногенной активностью), если он введен отдельно или факультативно с подходящим адъювантом животному, такому как млекопитающее, например, кролику или мыши, также включая человека; причем такой иммунный ответ принимает форму стимуляции Т-клеточного ответа у животного-реципиента, такого как человек. Альтернативно «активный фрагмент» может также быть использован для инициации ответа Т-клетки *in vitro*.

В контексте настоящего описания понятия «участок», «сегмент» и «фрагмент», если они использованы по отношению к полипептидам, относятся к непрерывной последовательности остатков, таких как аминокислотные остатки, последовательность которых формирует подкласс более крупной последовательности. Например, если полипептид был подвергнут обработке любой из известных эндопептидаз, таких как трипсин или химотрипсин, то полученные в результате такой обработки олигопептиды будут представлять участки, сегменты или фрагменты исходного полипептида. При использовании по отношению к полинуклеотидам эти понятия относятся к продуктам, полученным при обработке указанных полинуклеотидов любой из эндонуклеаз.

В соответствии с настоящим изобретением понятие «процентная доля идентичности» или «идентичный с процентной долей», если оно относится к последовательности, означает, что последовательность сравнивается с заявленной или описанной последовательностью после выравнивания сравниваемой последовательности («Сравниваемая последовательность») с описанной или заявленной последовательностью («Контрольная последовательность»). Процентная доля идентичности определяется затем по следующей формуле:

Процентная доля идентичности = $100 [1 - (C/R)]$

где «С» является числом различий между Контрольной последовательностью и Сравняваемой последовательностью по длине выравнивания между Контрольной последовательностью и Сравняваемой последовательностью, где

- (i) каждое основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего выравненного основания или аминокислоты в Сравняваемой последовательности, и
 - (ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и
 - (iii) каждое выравненное основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые отличаются от выравненного основания или аминокислоты в Сравняваемой последовательности, представляют собой различие; и
 - (iiii) выравнивание должно начинаться с позиции 1 выравненных последовательностей;
- и «R» - это число оснований или аминокислот в Контрольной последовательности по длине выравнивания со Сравняваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в Контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

Если существует противопоставление между Сравняваемой последовательностью и Контрольной последовательностью, для которых процентная доля идентичности, по расчетам выше, приблизительно равна или выше установленной минимальной Процентной доли идентичности, тогда Сравняваемая последовательность имеет установленную минимальную процентную долю идентичности с Контрольной последовательностью, если даже могут существовать выравнивания, в которых подсчитанная здесь выше Процентная доля идентичности меньше, чем установленная Процентная доля идентичности.

Исходные (немодифицированные) пептиды, раскрываемые в данном описании, могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких остатков в различных, возможно отобранных, участках по длине пептидной цепи, если не заявлено иное.

Предпочтительно, если такие замены расположены на конце аминокислотной цепи. Такие замены могут носить консервативный характер, например, когда одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, так же как при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативной будет замена аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, как, например, при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей

внутри семейств встречающихся в природе гомологичных белков определенные замены аминокислот допускаются чаще, чем другие, и они часто связаны со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и таковой является основа определения «консервативных замен».

Консервативные замены определены в контексте настоящего описания как обмены внутри одной из последующих пяти групп: группа 1 – малые, алифатические, неполярные или слабо полярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); группа 2 – полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln); группа 3 – полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys); группа 4 – крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); и группа 5 – крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина остатком изолейцина. Высоко неконсервативные замены могут охватывать замену кислой аминокислоты полярной, или даже такой, которая имеет основной характер. Такие «радикальные» замены не могут, однако, быть отвергнуты как потенциально неэффективные из-за того, что химические эффекты не полностью предсказуемы, и радикальные замены могут неожиданно привести к благоприятным эффектам, не предсказуемых исходя из обычных химических принципов.

Разумеется, в таких заменах могут участвовать другие структуры, отличающиеся от обычных L-аминокислот. Таким образом, D-аминокислоты могут быть заменены L-аминокислотами, обычно встречающимися в антигенных пептидах по изобретению и также охватываемые настоящим раскрытием сущности изобретения. Кроме того, аминокислоты, содержащие нестандартные R-группы (т.е. R-группы, отличающиеся от обнаруженных в повсеместно встречающихся 20 аминокислотах природных белков) могут быть также использованы в целях замены для получения иммуногена и иммуногенных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением.

Если были произведены замены на более чем одной позиции с получением пептида по существу эквивалентной или большей антигенной активностью, как определено ниже, то комбинации таких замен будут проанализированы для определения того, приведут ли эти комбинации

замен к дополнительным или синергетическим эффектам по отношению к антигенности пептида. По большей части замены должны производиться не более чем в 4 позициях внутри пептида одновременно.

Пептиды по изобретению могут быть удлинены с помощью вплоть до четырех аминокислот, это значит, что 1, 2, 3 или 4 аминокислоты могут быть добавлены к одному из концов в любой комбинации, представленной между 4:0 и 0:4.

Комбинации элонгации в соответствии с изобретением могут быть взяты из **Таблицы 3**:

С-конец	N-конец
4	0
3	0 или 1
2	0 или 1 или 2
1	0 или 1 или 2 или 3
0	0 или 1 или 2 или 3 или 4
N-конец	С-конец
4	0
3	0 или 1
2	0 или 1 или 2
1	0 или 1 или 2 или 3
0	0 или 1 или 2 или 3 или 4

Аминокислотами для элонгации могут быть пептиды исходной последовательности белка или любой другой аминокислотой. Элонгация может быть использована для повышения стабильности или растворимости пептидов.

Понятие «Т-клеточный ответ» означает специфическую пролиферацию и активацию эффекторных функций, индуцированных пептидом *in vitro* или *in vivo*. Для ЦТЛ, рестриктированных по МНС I класса, эффекторными функциями может быть лизис клеток-мишеней, нагруженных пептидом, нагруженных предшественником пептида или клеток-мишеней, естественно презентующих пептид; секреция цитокинов, предпочтительно интерферона-гамма, TNF-альфа или ИЛ-2, индуцированная пептидом; секреция эффекторных молекул, предпочтительно гранзимов или перфоринов, индуцированная пептидом, или дегрануляция.

Предпочтительно, если ЦТЛ, специфичные для пептида с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 92, испытаны на наличие замещённых пептидов; концентрация пептида, при которой замещённые пептиды достигают половины максимального роста лизиса относительно фона, составляет не более чем около 1 мМ, предпочтительно, не более чем около 1 мкМ, более предпочтительно, не более чем около 1 нМ, и ещё более предпочтительно не более чем около 100 пМ и, наиболее предпочтительно, не более чем около 10 пМ. Также предпочтительно, чтобы замещенный пептид распознавался ЦТЛ более чем одного индивида, по меньшей мере двух и, более предпочтительно, трех индивидов.

Таким образом, эпитопы настоящего изобретения могут быть идентичны встречающимся в природе опухолеассоциированным или опухолеспецифическим эпитопам или могут включать эпитопы, отличающиеся не более чем 4 остатками от контрольного пептида, при условии, что они имеют, по существу, идентичную антигенную активность.

Стимуляция иммунных ответов зависит от присутствия антигенов, распознаваемых иммунной системой хозяина как чужеродные. Открытие существования опухолеассоциированных антигенов повысило сейчас возможность использования иммунной системы хозяина для вмешательства в рост опухоли. В настоящее время исследуются различные механизмы использования для иммунотерапии рака обеих ветвей иммунной системы, как гуморальной, так и клеточной.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС), связанные с пептидами, имеющими обычно 8-12 аминокислотных остатков, образованных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоли, играют важную роль в этом ответе. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Молекулы МНС I класса могут встречаться на большинстве клеток, имеющих ядро, которые презентруют пептиды, образующиеся после протеолитического расщепления преимущественно эндогенных, цитозольных или ядерных белков, DRIPS, и более крупных пептидов.

Однако пептиды, образованные из эндосомальных компартментов или экзогенных источников, также часто встречаются на молекулах МНС I класса. Этот неклассический способ презентации классом I в литературе называется кросс-презентацией.

Так как оба вида ответов, зависящие от CD8 и от CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и синергически, то идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых как CD8-положительными ЦТЛ (молекула МНС I класса), так и CD4-положительными ЦТЛ (молекула МНС II класса) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин. Поэтому целью настоящего изобретения является обеспечение композиций пептидов, которые содержат пептиды, связывающиеся с комплексами МНС любого класса.

Ввиду серьезных побочных эффектов и расходов, связанных с лечением рака, крайне необходимы улучшенные методы прогнозирования и диагностики. Поэтому существует необходимость в идентификации других факторов, представляющих собой биомаркеры рака вообще и рака легких, в частности. Кроме того, существует необходимость в идентификации факторов, которые могут быть использованы при лечении рака вообще и рака легких, в частности.

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний / опухолей, предпочтительно раковых заболеваний легких, еще более предпочтительно немелкоклеточной карциномы легких (НМРЛ), клетки которых экспрессируют в избытке или презентируют исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ образцов первичного рака легких человека, эти пептиды презентировались в естественных условиях молекулами НЛА (см. Пример 1 и Фигуру 1).

Как было показано, исходный ген/белок (называемый также «белком полной длины» или «базовым белком»), из которого были получены пептиды, был в высокой степени гиперэкспрессирован при немелкоклеточной карциноме легких, и последовательности с SEQ ID No. 66 по 75 рака желудка и глиобластомы по сравнению с нормальными тканями (см. Пример 2 и Фигуру 2 для НМРЛ), демонстрируя высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью. Более того, сами пептиды избыточно презентируются на опухолевой ткани, но не на нормальных тканях (см. Пример 3 и Фигуру 3).

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами/Т-клетками. Т-клетки могут разрушать клетки, презентующие распознанный комплекс HLA/пептид; к примеру, клетки рака легких, презентующие полученные пептиды.

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентуются и, поэтому, могут использоваться для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. Пример 4 и Фигуру 4). Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках. Таким образом, пептиды настоящего изобретения пригодны для генерирования иммунного ответа в организме пациента для уничтожения опухолевых клеток. Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т.е. адьювантом). От иммунного ответа, вызванного такой терапевтической вакцинацией, может ожидаться, что он будет высоко специфическим против опухолевых клеток, так как целевые пептиды настоящего изобретения не презентуются на нормальных тканях в сравнимом количестве копий, предотвращая, тем самым, риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

Фармацевтические композиции включают пептиды как в свободной форме, так и в форме фармацевтически приемлемой соли. Используемое в контексте данного изобретения понятие «фармацевтически приемлемая соль» относится к производным раскрытых пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислых или основных солей вещества. Например, кислые соли получают из свободного основания (в основном, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу $-NH_2$) с использованием реакции с подходящей кислотой. Подходящие кислоты для получения кислотных солей включают как органические кислоты, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бен-

зойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфо кислоту, салициловую кислоту и подобные, так и неорганические кислоты, например, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобные. И наоборот, приготовление основных солей кислотных компонентов, которые могут присутствовать на пептиде, готовятся при использовании фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин и тому подобных.

В одном особенно предпочтительном варианте осуществления фармацевтические композиции включают пептиды в виде солей уксусной кислоты (ацетаты), трифторацетатов или соляной кислоты (хлориды).

Кроме того, пептиды настоящего изобретения пригодны не только для лечения рака, но и также в качестве диагностических средств. Так как пептиды были получены из *клеток рака легкого*, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в небольшом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

Присутствие заявленных пептидов на тканевых биоптатах может помочь патоморфологу в постановке диагноза рака. Выявление конкретных пептидов с помощью антител, масс-спектрометрии или других методов, известных из уровня техники, могут дать патоморфологу свидетельства того, что ткань является злокачественной или воспаленной или же пораженной заболеванием вообще. Присутствие групп пептидов может позволить классифицировать или выделить подклассы пораженных тканей.

Обнаружение пептидов на образцах пораженной заболеванием ткани может позволить принять решение о преимуществах от терапии, воздействующей на иммунную систему, в особенности, если Т-лимфоциты, как известно или ожидается, задействованы в механизме действия. Отсутствие экспрессии МНС является хорошо описанным механизмом, при котором инфицированные или злокачественные клетки уклоняются от иммунного контроля. Таким образом, присутствие пептидов показывает, что этот механизм не используется проанализированными клетками.

Пептиды настоящего изобретения могут использоваться в анализе ответов лимфоцитов против этих пептидов, таких как Т-клеточные ответы или ответы антител против пептида или пептида в комплексе с молекулами МНС. Данные ответы лимфоцитов могут использоваться в качестве прогностических маркеров для принятия решения о дальнейших этапах терапии. Данные ответы могут также использоваться в качестве суррогатных маркеров в иммунотерапевтических подходах, направленных на индуцирование ответов лимфоцитов с помощью различных средств, например, вакцинации белком, нуклеиновыми кислотами, аутологичными материалами, адоптивным переносом лимфоцитов. В условиях, когда проводится генная терапия, в целях оценки побочных эффектов могут быть проанализированы ответы лимфоцитов на пептиды. Мониторинг реакций лимфоцитов может также быть ценным инструментом для обследований в рамках последующего наблюдения после трансплантации, к примеру, для выявления реакций «хозяин против трансплантата» и «трансплантат против хозяина».

Пептиды настоящего изобретения могут использоваться для выработки и накопления специфических антител к комплексам МНС/пептид. Они могут быть использованы в терапии, нацеливающей токсины или радиоактивные вещества на пораженную ткань. Другим видом использования данных антител может быть «нацеливание» радионуклидов на пораженную ткань в целях визуализации, такой как ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография). Это может помочь в обнаружении небольших метастазов или в определении размера и точной локализации пораженных тканей.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ получения рекомбинантного антитела, специфически связывающегося с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) класса I или II в комплексе с рестриктированным по HLA антигеном, причем способ включает: иммунизацию измененного методом генной инженерии, не являющегося человеком млекопитающего, содержащего клетки, экспрессирующие молекулы указанного главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) класса I или II с растворимой формой молекулы МНС класса I или II в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном; выделение молекул мРНК из продуцирующих антитела клеток указанного не являющегося человеком млекопитающего; создание библиотеки фагового отображения, отображающего белковые молекулы, закодированные указанными молекулами мРНК; и выделение, по меньшей мере, одного фага из указанной библиотеки фагового отображения, причем указан-

ный, по меньшей мере, один фаг, экспонирует на поверхности указанное антитело, специфически связывающееся с указанным главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) класса I или II в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном.

В другом аспекте изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) класса I или II в комплексе с рестриктированным по HLA антигеном, где антитело предпочтительно является поликлональным антителом, моноклональным антителом, биспецифичным антителом и/или химерным антителом.

Кроме того, еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения указанного антитела, специфически связывающегося с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с HLA-рестриктированным антигеном, причем этот способ включает: иммунизацию полученного с помощью методов генной инженерии не являющегося человеком млекопитающего, содержащего клетки, экспрессирующие указанный главный комплекс гистосовместимости человека (МНС) I или II класса с растворимой формой молекулы МНС I или II класса в комплексе с указанным HLA-рестриктированным антигеном; выделение молекул мРНК из продуцирующих антитела клеток указанного не являющегося человеком млекопитающего; получение библиотеки фагового отображения, содержащей фаги, экспонирующие белковые молекулы, закодированные указанными молекулами мРНК; и выделение, по меньшей мере, одного фага из указанной библиотеки фагового отображения, причем указанный, по меньшей мере, один фаг, экспонирует на поверхности указанное антитело, специфически связывающееся с указанным главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с указанным HLA-рестриктированным антигеном. Соответствующие способы получения таких антител и одноцепочечных главных комплексов гистосовместимости I класса, в равной степени как и другие инструменты для получения данных антител, раскрыты в патентных заявках WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 и у 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; и Cohen CJ, Sarig O, Yamano Y, Tomaru U, Ja-

cobson 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, которые все в целях настоящего изобретения в явном виде включены во всей полноте путем ссылки.

Предпочтительно, если антитело связывается с аффинностью связывания ниже 20 наномолей, предпочтительно ниже 10 наномолей, с комплексом, который называется "специфическим" в контексте настоящего изобретения.

В другом аспекте изобретения предложен способ получения растворимого Т-клеточного рецептора, распознающего специфический комплекс пептида и МНС. Такие растворимые Т-клеточные рецепторы могут быть получены из специфических Т-клеточных клонов, и их аффинность может быть повышена за счет мутагенеза, направленного на определяющие комплементарность участки. Для выбора Т-клеточного рецептора может использоваться фаговое отображение (заявка США 2010/0113300, Liddy N, Bossi G, Adams KJ, Lissina A, Mahon TM, Hassan NJ, et al. Monoclonal TCR-redirectioned tumor cell killing. *Nat Med* 2012 Jun; 18(6):980-987). В целях стабилизации Т-клеточных рецепторов во время фагового отображения и в случае практического применения в качестве лекарственного средства альфа- и бета-цепи могут быть связаны, например, посредством не встречающихся в природе дисульфидных связей, других ковалентных связей (одноцепочечный Т-клеточный рецептор) или с помощью доменов димеризации (см. 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). В целях выполнения определенных функций на клетках-мишенях Т-клеточный рецептор может быть связан с токсинами, лекарственными средствами, цитокинами (см. заявку США 2013/0115191), доменами, рекрутирующими эффекторные клетки, такими как анти-CD3 домен, и т. д. Более того, он может быть экспрессирован на Т-клетках, используемых для адоптивного переноса.

Дополнительную информацию можно найти в патентных заявках WO 2004/033685A1 и WO 2004/074322A1. Комбинация растворимых ТКР описывается в патентной заявке WO 2012/056407A1. Другие способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586A1.

Кроме того, пептиды могут быть использованы для подтверждения диагноза рака, поставленного патологом на основании исследования биоптата.

Для выбора презентуемых в избытке пептидов был рассчитан профиль презентации, позволяющий оценить медианное значение презентации образца, а также вариации повторов. В профиле сравниваются образцы опухолевой формы, представляющей интерес, с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Каждый из этих профилей может быть затем консолидирован в показатель избыточной презентации путем расчета значения p по линейной модели со смешанными эффектами (J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, Sarkar D., R Core team. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. 2008), скорректировав ее для повторных анализов на уровень ложноположительных результатов (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).

Для идентификации и относительной количественной оценки лигандов HLA с помощью масс-спектрометрического анализа молекулы HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были очищены и из них выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены и последовательности были идентифицированы с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS) с ионизацией электрораспылением (nanoESI) в режиме реального времени. Полученные пептидные последовательности подтверждали сравнением картины фрагментации природных пептидов TUMAP, записанной на образцах НМРЛ, с картинами фрагментации соответствующих синтетических контрольных пептидов с идентичными последовательностями. Поскольку пептиды были идентифицированы непосредственно в качестве лигандов молекул HLA первичных опухолей, то эти результаты дают прямое доказательство естественного процессирования и презентации идентифицированных пептидов на первичной ткани, полученной от пациентов с НМРЛ.

Запатентованная технологическая платформа лекарственных средств, находящихся в разработке, XPRESIDENT® v2.1 (см., например, патентную заявку США 2013-0096016, включен-

ную в настоящее описание в своей полноте путем ссылки) позволяет произвести идентификацию и выбор соответствующих избыточно презентуемых пептидов в качестве кандидатов для вакцины, основываясь на прямом относительном количественном определении уровней HLA-рестриктированных пептидов на раковой ткани в сравнении с несколькими различными нераковыми тканями и органами. Это было осуществлено путем разработки дифференциального количественного определения на основе данных ЖХ-МС без использования изотопной метки (label-free), обработанных запатентованной технологической платформой для анализа данных, объединяющей алгоритмы для идентификации последовательности, спектральной кластеризации, подсчета ионов, выравнивания времени удерживания, деконволюции по состояниям заряда и нормализации.

Для каждого пептида и образца были подсчитаны уровни презентации, включающие оценки погрешности. Были идентифицированы пептиды, презентуемые исключительно на опухолевой ткани, и пептиды, избыточно презентуемые на опухолевых тканях в сравнении с не пораженными раком тканями и органами.

Комплексы HLA-пептид, полученные из более 50 образцов опухолевой ткани НМРЛ, подвергнутых шоковой заморозке, были очищены; HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС.

Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах первичных опухолей НМРЛ, что подтверждает их презентацию на клетках первичного НМРЛ.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных образцах тканей НМРЛ и нормальных тканей, были подвергнуты количественному анализу с помощью ЖХ/МС без использования изотопной метки, с использованием подсчета ионов. Метод основан на предположении, что площади пика пептида при анализе методом ЖХ/МС коррелируют с его содержанием в образце. Все количественные сигналы пептида в различных экспериментах с использованием ЖХ/МС были нормализованы, исходя из основной тенденции, было вычислено их среднее значение на образец, и сведены в гистограмму в т. н. профиль презентации. В профиле презентации консолидированы различные методы анализа, такие как поиск в базе данных белков, спектральная кластеризация, деконволюция состояния заряда (разряд) и выравнивание времени удерживания и нормализация.

Таким образом, настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, выбранную из группы с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92, или его варианту, который по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, идентичен) последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92, где указанный вариант индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, где указанный пептид не является полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и с SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92 или его варианту, который по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и с SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину между 8 и 100, предпочтительно между 8 и 30 и, наиболее предпочтительно, между 8 и 14 аминокислотами.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, способным связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид состоит или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и с SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид является слитым белком, в частности включающим N-терминальные аминокислоты HLA-DR антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii), или где пептид слит с антителом (или слит с последовательностью антитела), например, таким антителом, которое является специфичным для дендритных клеток.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептиды в соответствии с изобретением, при условии, что пептид не является полностью человеческим белком.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте в соответствии с изобретением, которая является ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями.

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному экспрессировать нуклеиновую кислоту в соответствии с изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с изобретением для применения в медицине.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину, включающей нуклеиновую кислоту в соответствии с изобретением или вектор экспрессии в соответствии с изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину в соответствии с изобретением, которая является антиген-презентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину в соответствии с изобретением, где антиген-презентирующая клетка является дендритной клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения пептида в соответствии с изобретением, причем способ включает культивацию описанной клетки-хозяина и выделение пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) *in vitro*, причем способ включает контактирование ЦТЛ *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами человеческого МНС I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом указанных ЦТЛ, где указанный антиген является любым пептидом в соответствии с изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к описанному способу, где указанный антиген нагружен на молекулы МНС I или II класса, экспрессированные на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки при контактировании достаточного количества антигена с антигенпрезентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92 или указанный вариант аминокислотной последовательности.

Настоящее изобретение далее относится к активированным цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ), полученным способом в соответствии с изобретением, которые селективно распознают клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий описанную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с изобретением, причем способ включает введение пациенту эффективного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в соответствии с изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к применению любого пептида в соответствии с изобретением, нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, вектора экспрессии в соответствии с изобретением, клетки в соответствии с изобретением или активированного цитотоксического Т-лимфоцита в соответствии с изобретением в качестве лекарственного средства или в производстве лекарственного средства.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с изобретением, где лекарственное средство является вакциной.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с изобретением, где лекарственное средство проявляет противораковую активность.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками рака легких, желудка, желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы или почек.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, которые могут быть использованы для прогнозирования рака легких.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению новых мишеней, как описано в соответствии с настоящим изобретением для лечения рака.

Понятие «антитело» или «антитела» используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или «полным» молекулам иммуноглобулина в понятие «антитела» включены также фрагменты или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с полипептидным маркером рака легких, доставляют токсин к клетке рака легких, экспрессирующей ген-маркер рака легких на повышенном уровне и/или ингибируют активность ракового полипептида-маркера) в соответствии с настоящим изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры рака легких полной длины, так и их фрагменты. Полипептид, необходимый для получения антитела по изобретению, может быть частично или полностью очищенным из природного источника или же может быть получен с использованием методики рекомбинантной ДНК.

Например, кДНК, кодирующая ABCA13, MMP12, DST, MXRA5, CDK4, HNRNPH, TANC2, IRNF213, SMYD3 и SLC34A2 или любой другой полипептид с последовательностью с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и с SEQ ID No. 92 или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, дрожжей, насекомых или клетках млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата из

моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с пептидным маркером рака легкого, использованным для получения антитела по изобретению.

Специалисту данной области будет понятно, что получение двух или более различных наборов моноклональных или поликлональных антител увеличивает вероятность получения антитела со специфичностью и аффинностью, необходимыми для предназначенного для него использования (например, для ELISA, иммуногистохимии, визуализации *in vivo*, терапии на основе иммунотоксина). Антитела испытаны на желаемую для них активность с помощью известных методов в соответствии с целью применения антител (например, для ELISA, иммуногистохимии, иммунотерапии и т.д.; для получения дальнейшей информации по получению и испытанию антител см., например, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, new 2nd edition 2013). Например, антитела могут быть исследованы с помощью ELISA, метода иммунного блоттинга (Western-blot), иммуногистохимического окрашивания законсервированных формальдегидом образцов рака легкого или замороженных тканевых срезов. После первоначального определения их характеристик *in vitro* антитела, предназначенные для терапевтического или диагностического применения *in vivo* исследуют в соответствии с известными клиническими методами анализа.

Понятие «моноклональное антитело» в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное из, по существу, гомогенной популяции антител, т. е. отдельные антитела внутри популяции идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть представлены в небольших количествах. Моноклональные антитела в контексте настоящего изобретения конкретно включают «химерные» антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретных видов или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная(ые) цепь(и) идентична(ы) с или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, полученных из других видов или относящихся к другому классу или подклассу антител, в равной степени как и фрагменты таких антител, пока они проявляют желаемую антагонистическую активность (Патент США № 4 816 567, который включен в настоящее описание по ссылке в полном объеме).

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены при использовании гибридного метода. В рамках гибридного метода мышь или другое подходящее животное-хо-

зияин обычно иммунизируется иммунизирующим веществом, чтобы инициировать лимфоциты, которые вырабатывают или способны вырабатывать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим веществом. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

Моноклональные антитела могут быть также получены с помощью способов с рекомбинантной ДНК, таких как описываемые в патенте США № 4 816 567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела по изобретению, может быть легко выделена и секвенирована с помощью стандартных методик (например, при использовании олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышечных антител).

In vitro-методы также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в особенности Fab-фрагментов, может быть произведено при использовании стандартных методик, известных из уровня техники. К примеру, расщепление может производиться при использовании папаина. Примеры расщепления под воздействием папаина описываются в заявке WO 94/29348, опубликованной 22.12.1994 г., и в патенте США № 4 342 566. Расщепление антител под воздействием папаина обычно приводит к двум идентичным фрагментам, связывающимся с антигеном, называемым Fab-фрагментами, каждый из которых имеет отдельный антиген-связывающий сайт и остаточный Fc-фрагмент. В результате воздействия пепсином получается фрагмент, который имеет два антиген-связывающих центра и все еще способен к поперечной сшивке антигена.

Фрагменты антитела, как связанные с другими последовательностями так и не связанные, могут также включать вставки, делеции, замещения или другие избранные модификации конкретных участков или специфических аминокислотных остатков при условии, что активность фрагмента незначительно изменена или повреждена по сравнению с немодифицированным антителом или фрагментом антитела. Данные модификации могут внести некоторые дополнительные свойства, такие как добавление/удаление аминокислот, способных к дисульфидному связыванию, увеличение их биологической стойкости, изменение их секреторных характеристик и т.д. В любом случае, фрагмент антитела должен обладать свойством биологической активности, таким как активностью связывания, регуляцией связывания на связывающем домене и т.д. Функциональные или активные участки антитела могут быть идентифицированы

при мутагенезе конкретного участка белка с последующей экспрессией и контролем экспрессированного полипептида. Такие методы полностью очевидны для опытного специалиста данной области и могут включать сайт-специфический мутагенез нуклеиновой кислоты, кодирующей фрагмент антитела.

Антитела по изобретению могут далее включать гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител - это химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab' или другие антиген-связывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированном CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют таковым из нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по сути все из участков FR являются таковыми консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Способы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны из уровня техники. В целом, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотный остаток, введенный в него из источника, не являющегося человеческим. Такие аминокислотные остатки называются нечеловеческого происхождения часто «импортированными» остатками, которые обычно берутся из «импортированного» переменного домена. Гуманизация может быть по существу произведена посредством замены участков CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патент США № 4 816 567), где существенно меньшая часть, чем интактный человеческий переменный домен, была заменена

соответствующей последовательностью вида, отличного от человека. На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

Использоваться могут трансгенные животные (например, мыши), которые способны при иммунизации вырабатывать полный спектр человеческих антител при отсутствии выработки эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена, кодирующего участок присоединения тяжелой цепи антитела у химерных и мутантных мышей зародышевой линии, приводит к полному ингибированию выработки эндогенных антител. Перенос генов иммуноглобулина клеток зародышевой линии человека в таких мутантных мышей зародышевой линии будет приводить к выработке человеческих антител с антигенной стимуляцией. Человеческие антитела могут быть также получены в библиотеках фагового дисплея.

Антитела по изобретению предпочтительно вводятся в субъект в фармацевтически приемлемом носителе. Подходящее количество фармацевтически приемлемой соли обычно используется в составе для придания композиции изотоничности. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Уровень pH раствора составляет, предпочтительно, от около 5 до около 8 и, более предпочтительно, от около 7 до около 7,5. Кроме того, носители включают препараты пролонгированного высвобождения, такие как полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, матрицы которых имеют вид профилированных объектов, к примеру, пленки, липосомы или микрочастицы. Для специалиста данной области будет очевидно, что определенные носители могут быть более предпочтительными в зависимости от, например, способа введения и концентрации вводимого антитела.

Антитела могут вводиться субъекту, пациенту или в клетку посредством инъекции (например, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно) или другими способами, такими как вливание, которое гарантирует доставку к кровотоку эффективным образом. Антитела также могут вводиться интратуморальными или перитуморальными способами, чтобы вызвать локальные, а также и системные терапевтические эффекты. Предпочтительными являются местное или внутривенное введение.

Эффективная дозировка и график введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таких решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых лекарственных средств. Типичная дневная дозировка антитела, используемого отдельно, может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела для лечения рака легкого эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака легкого в организме субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака легкого.

Так как маркеры опухоли легкого ABCA13, MMP12 по изобретению высоко экспрессированы в клетках рака легкого и экспрессированы на чрезвычайно низких уровнях в нормальных клетках, ингибирование экспрессии ABCA13 и MMP12 или активности полипептидов может быть интегрировано в любую терапевтическую стратегию для лечения или предупреждения НМРЛ.

Принцип антисмысловой терапии основан на гипотезе, что последовательность-специфическое подавление генной экспрессии (посредством транскрипции или трансляции) может быть достигнуто при внутриклеточной гибридизации между геномной ДНК или мРНК и комплементарными антисмысловыми соединениями. Образование такого гибридного дуплекса нуклеиновых кислот препятствует транскрипции геномной ДНК, кодирующей антиген-мишень, или процессингу/транспорту/трансляции и/или стабильности мРНК опухолевого антигена-мишени.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты могут быть доставлены с использованием различных подходов. Например, антисмысловые олигонуклеотиды или антисмысловая РНК могут вводиться непосредственно (например, внутривенной инъекцией) субъекту в форме, которая позволяет поглощение опухолевыми клетками. Альтернативно в клетки могут вводиться вирусные или плазмидные векторы *in vivo*, которые кодируют антисмысловую РНК (или фрагменты

РНК). Антисмысловые эффекты также могут быть вызваны смысловыми последовательностями; однако степень фенотипических изменений крайне изменчива. Фенотипические изменения, индуцированные эффективной антисмысловой терапией, оценивались в соответствии с изменениями, например, уровнями мРНК-мишени, уровнями белка-мишени и/или уровнями активности белка-мишени.

В конкретном примере ингибирование функции маркера рака легкого с помощью генной терапии с применением антисмысловых конструкций может быть выполнено посредством прямого введения субъекту РНК комплементарной маркерной РНК опухоли легкого. РНК, комплементарную маркерной РНК опухоли, можно получить и выделить с помощью любой стандартной методики, но наиболее просто ее получить с помощью транскрипции *in vitro* с использованием ДНК, комплементарной маркерной ДНК опухоли, под контролем высокоэффективного промотора (например, Т7-промотора). Введение комплементарной маркерной РНК опухоли в клетки может быть произведено любым способом прямого введения нуклеиновых кислот, описываемых ниже.

Альтернативная стратегия ингибирования функции АВСА13 и ММР12 при использовании генной терапии включает внутриклеточную экспрессию антител к АВСА13 и ММР12 или фрагмента антител к АВСА13 и ММР12. Например, ген (или фрагмент гена), кодирующий моноклональное антитело, которое специфически связывается с полипептидом АВСА13, ММР12 и ингибирует его биологическую активность, помещают под контроль транскрипции специфической (например, ткане- или опухоль-специфической) регуляторной последовательности генов в пределах вектора экспрессии нуклеиновой кислоты. Вектор вводится затем субъекту так, чтобы он поглощался клетками рака легкого или другими клетками, которые затем секретируют антитела к АВСА13, ММР12 и, тем самым, блокируют биологическую активность полипептида АВСА13, ММР12. Предпочтительно, если полипептиды АВСА13, ММР12 присутствуют на внеклеточной поверхности клеток рака желудка.

В способах, описываемых выше, которые включают введение и поглощение экзогенной ДНК клетками субъекта (т.е. генную трансдукцию или трансфекцию), нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть в форме «обнаженной» ДНК, или же нуклеиновые кислоты могут быть в векторе для доставки нуклеиновых кислот к клеткам для ингибирования экспрессии белка-маркера опухоли желудка. Вектор может представлять собой имеющийся в продаже препарат, такой как аденовирусный вектор (Quantum Biotechnologies, Inc. (Лаваль,

Квебек, Канада). Доставка нуклеиновой кислоты или вектора к клеткам может производиться посредством различных механизмов. Например, доставка может производиться с помощью липосомы с использованием имеющихся в продаже липосомных препаратов, таких как LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-25 BRL, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд, США), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Хильден, Германия) и TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Мэдисон, Висконсин, США), в равной степени как и других липосом, разработанных в соответствии со стандартными процедурами уровня техники. Кроме того, нуклеиновая кислота или вектор в соответствии с настоящим изобретением может быть доставлен *in vivo* посредством электропорации, технология которой имеется в наличии в компании "Genetronics, Inc." (Сан-Диего, Калифорния, США), в равной степени как и с помощью устройства "SONOPORATION machine" (ImaRx Pharmaceutical Corp., Таксон, штат Аризона, США).

Одним из примеров является векторная доставка посредством вирусной системы, такой как ретровирусная векторная система, которая способна упаковывать рекомбинантный ретровирусный геном. Рекомбинантный ретровирус может быть затем использован, чтобы инфицировать и таким образом доставить к инфицированным клеткам антисмысловую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию ABCA13 и MMP12. Точный способ введения измененной нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающего, разумеется, не ограничивается использованием ретровирусных векторов. Имеется широкий спектр других методик для данной процедуры, включая использование аденовирусных векторов, адено-ассоциированных вирусных (AAV) векторов, лентивирусных векторов, псевдотипированных ретровирусных векторов. Также могут применяться методики физической трансдукции, такие как липосомная доставка и рецептор-опосредованные и другие механизмы эндоцитоза. Данное изобретение может быть использовано вместе с любым из этих или других используемых обычно способов генного переноса.

Антитела могут также применяться для диагностических анализов *in vivo*. Как правило, антитело помечают радионуклеотидом (таким как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P или ^{35}S), так что опухоль может быть локализована с помощью иммуносцинтиграфии. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты связываются с внеклеточными доменами двух или более мишеней ABCA13, MMP12 при показателе аффинности (Kd) ниже чем 1×10^{-6} мкМ.

Антитела для диагностического применения могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но

без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию; флюороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, флуоресцеин, родамин, эозин и другие флюорофоры, радиоизотопы, золото, гадолиний и другие лантаноиды, парамагнитное железо, фтор-18 и другие позитронно-активные радионуклиды. Более того, зонды могут быть би- или мультифункциональными и обнаруживаться более чем одним из приведенных способов. Данные антитела могут быть помечены напрямую или опосредованно указанными зондами. Присоединение зондов к антителам включает ковалентное присоединение зонда, внедрение зонда в антитело и ковалентное присоединение хелатирующего соединения для присоединения зонда, широко признанное среди прочих в данной области. Для иммуногистохимических исследований образец пораженной ткани может быть свежим или замороженным или может быть залит парафином и зафиксирован таким консервантом, как формалин. Зафиксированный или залитый срез содержит образец, контактировавший с помеченным первичным антителом и вторичным антителом, где антитело используется для обнаружения экспрессии белков ABCA13, MMP12 *in situ*.

В настоящем изобретении предложен пептид, включающий последовательность, которая выбирается из группы с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92, или его вариант, который на 90% гомологичен последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92, или его вариант, который будет индуцировать перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом.

Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I и/или II класса.

В настоящем изобретении термин «гомологичный» относится к степени идентичности (см. выше, Процентная доля идентичности) между последовательностями двух аминокислотных последовательностей, т.е. пептидных или полипептидных последовательностей. Упомянутая ранее «гомология» определяется при сравнении двух последовательностей, сопоставляемых в оптимальных условиях для сравниваемых последовательностей. Такая гомология последовательностей может быть подсчитана с помощью создания выравнивания, например, по алгоритму ClustalW. Широко распространено программное обеспечение для анализа последовательностей, в частности, Vector NTI, GENETYX или другие аналитические инструменты, предоставляемые банками данных свободного доступа.

Специалист данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вариантом специфического пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Fong et al., 2001); (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay et al., 2006).

Под термином «вариант» данной аминокислотной последовательности изобретатели имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков изменены (например, при их замещении боковой цепью другого встречающегося в природе аминокислотного остатка или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы МНС, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных ЦТЛ.

Данные ЦТЛ могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы (Rammensee et al., 1997) и банков данных (Rammensee et al., 1999) конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов обычно являются якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к связывающему мотиву рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности, с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохранят ли такие варианты способность связываться с молекулами МНС класса I или II. Варианты настоящего изобретения сохраняют способность связываться с ТКР активированных ЦТЛ, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

Те аминокислотные остатки, которые не вносят существенный вклад во взаимодействие с Т-клеточным рецептором, могут быть модифицированы заменой на другую аминокислоту, включение которой, по существу, не влияет на реактивность Т-клетки и не устраняет связывание с соответствующим МНС. Таким образом, помимо данного условия, пептид по изобретению может быть любым пептидом (в этот термин авторы изобретения включают олигопептиды или полипептиды), который включает аминокислотные последовательности или их участок или их вариант, как дано.

Таблица 4: Варианты и мотив пептида в соответствии с SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 или 7

		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ABCA13-001	Код пептида		I	L	F	E	I	N	P	K	L
SEQ ID No.	Варианты										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
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MMP12-003	Код пептида			I	Q	E	M	Q	H	F	L
SEQ ID No.	Варианты			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							
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DST-001	Код пептида			L	I	E	K	S	I	Y	L
SEQ ID No.	Варианты										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
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MXRA5-001	Код пептида			L	S	S	I	K	V	E	V
SEQ ID No.	Варианты										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
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CDK4-001	Код пептида			L	W	Y	R	A	P	E	V
SEQ ID No.	Варианты										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

Более длинные пептиды также могут быть пригодными. Также возможно, чтобы эпитопы МНС I класса, хотя они обычно имеют длину между 8-11 аминокислотами, генерировались при процессинге пептидов из более длинных пептидов или белков, включающих истинный эпитоп. Предпочтительно, чтобы остатки, которые примыкают к истинному эпитопу, существенно не влияли на протеолитическое расщепление, необходимое для презентации истинного эпитопа во время процессинга.

Соответственно, в настоящем изобретении предлагаются также пептидные эпитопы и эпитопы пептидных вариантов, связывающихся с молекулами МНС I класса, в которых указанный пептид или вариант имеет общую длину между 8 и 100, предпочтительно между 8 и 30, и, наиболее предпочтительно, между 8 и 14, а именно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 аминокислотами, в случае пептидов, связывающихся с молекулами МНС класса II, длина может также быть 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 33 аминокислоты.

Разумеется, пептид или вариант в соответствии с настоящим изобретением будет обладать способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса. Связывание пептида или варианта с комплексом МНС может быть проверено способами, известными из уровня техники.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 65 и SEQ ID NO 76 по SEQ ID NO 84 и SEQ ID NO 92.

«Состоящий преимущественно из» подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо последовательности в соответствии с любой из SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84, и SEQ ID No. 92 или один из его вариантов, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или C-конце последовательности аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для молекул МНС.

Тем не менее, эти фрагменты могут быть важны для обеспечения эффективного введения пептида в соответствии с настоящим изобретением в клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид является слитым белком, который включает, например, 80 N-терминальных аминокислот HLA-DR антиген-ассоциированной инвариантной цепи (р33, в дальнейшем "I"), как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды настоящего изобретения могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфическим для дендритных клеток.

Кроме того, пептид или вариант может быть далее модифицирован для улучшения стабильности и/или связывания с молекулами МНС в целях получения более сильного иммунного ответа. Методы такой оптимизации пептидной последовательности хорошо известны из уровня техники и включают, например, введение реверсированных пептидных или непептидных связей.

В реверсированной пептидной связи аминокислотные остатки присоединены не пептидными связями (-CO-NH-), а пептидная связь реверсируется. Такие ретро-обратные пептидомиметики могут быть получены методами, известными из уровня техники, например, такими, как описано в работе Meziere et al (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237, включённой сюда путем ссылки. Этот подход охватывает получение псевдопептидов, которые содержат изменения, охватывающие остов, но не ориентацию боковых цепей. Meziere и соавторы (1997) показывают, что эти псевдопептиды пригодны для связывания с МНС и индукции ответов Т-хелперных клеток. Ретро-инвертированные пептиды, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, намного более устойчивы к протеолизу.

Непептидной связью, является, например, -CH₂-NH, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей (-CH₂-NH) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции альдегида и аминокислоты в присутствии NaCNBH₃.

Пептиды, включающие последовательности, описанные выше, могут быть синтезированы с дополнительными химическими группами, находящимися на их аминном и/или карбоксильном концах, для увеличения стабильности, биологической доступности и/или аффинности пептидов. Например, гидрофобные группы, такие как карбобензоксильные, данзильные или трет-бутилоксикарбонильные группы, могут быть добавлены к аминным концам пептидов. Подобным образом, ацетильная группа или 9-фторенилметокси-карбонильная группа может быть размещена на аминных концах пептидов. Кроме того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа может быть добавлена к карбоксильным концам пептидов.

Далее, все пептиды по изобретению могут быть синтезированы в целях изменения их пространственной конфигурации. Например, может быть использован D-изомер одного или нескольких аминокислотных остатков пептида, а не обычный L-изомер. Более того по меньшей мере один из аминокислотных остатков пептидов по изобретению может быть замещен одним из хорошо известных не встречающихся в природе аминокислотных остатков. Изменения, такие как данные, могут служить для повышения стабильности, биологической доступности и/или связывающих свойств пептидов по изобретению.

Подобным образом, пептид или вариант по изобретению может быть модифицирован химическим способом посредством реакции отдельных аминокислот как до, так и после синтеза пептида. Примеры таких модификаций хорошо известны из уровня техники и обобщаются, например, в работе R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2005, которая включена в описание по ссылке. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксилонирования лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидной модификации карбоксильных групп и сульфгидрильной модификации с помощью окисления надмуравьиной кислотой цистеина до цистеиновой кислоты, образования производных ртути, образования смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями, реакции с малеимидом, карбоксиметилирования йодоуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирования цианатом при щелочном уровне pH, хотя не ограничиваясь ими. В этой связи специалист данной области может проконсультироваться с главой 15 в *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan и соавт. (John Wiley & Sons NY 1995-2000) для получения более обширной информации о методах, связанных с химической модификацией белков.

Вкратце, модификация, например, аргинильных остатков в белках часто основана на реакции вицинальных дикарбонильных соединений, таких как фенилглиоксаль, 2,3-бутандион и 1,2-циклогександион, с образованием аддукта. Другим примером является реакция метилглиоксаля с остатками аргинина. Цистеин может быть модифицирован без сопутствующей модификации других нуклеофильных сайтов, таких как лизин и гистидин. В результате для модификации цистеина доступно большое число реагентов. Веб-сайты компаний, таких как Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>), предоставляют информацию по конкретным реагентам.

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств.

К-реагент Вудворда может использоваться для модификации специфических остатков глутаминовой кислоты. N-(3-(диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты.

Например, диэтилпирокарбонат является реагентом для модификации гистидильных остатков в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-нонана.

Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения полиэтиленгликоля и основным сайтом модификации при гликозилировании белков.

Остатки метионина в белках могут быть модифицированы с помощью, например, йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

Тетранитрометан и N-ацетилимидазол могут быть использованы для модификации тирозильных остатков. Поперечная сшивка посредством образования дитирозина может быть произведена с помощью перекиси водорода/ионов меди.

В последних исследованиях по модификации триптофана использовались N-бромсукцинимид, 2-гидрокси-5-нитробензилбромид или 3-бром-3-метил-2-(2-нитрофенилмеркапто)-3Н-индол (BPNS-скатол).

Успешная модификация терапевтических белков и пептидов ПЭГ (полиэтиленгликолем) часто связана с увеличением полупериода циркуляции, тогда как поперечная сшивка белков глутаральдегидом, полиэтиленгликоль-диакрилатом и формальдегидом используется для получения гидрогелей. Химическая модификация аллергенов для иммунотерапии часто достигается при карбамоилировании цианатом калия.

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lu и соавторов (1981), и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высоко щелоче-лабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глютаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонилла (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламида, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамина (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Использованным агентом для соединения пептида и смолы, поддающимся расщеплению, является нестойкое к действию кислот производное 4-гидрокси-метилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глютамина, которые добавляются с применением метода обратного соединения, опосредованного N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксибензотриазолом. Все реакции

сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004) и прилагаемые ссылки).

Трифторуксусную кислоту удаляют выпариванием в вакууме с последующим измельчением с диэтиловым эфиром для получения сырого пептида. Любые представленные поглотители удаляются простой процедурой экстракции, которая при лиофилизации водной фазы позволяет получить сырой пептид без поглотителей. Реагенты для синтеза пептидов, как правило, имеются в наличии, например, в Calbiochem-Novabiochem (Великобритания) Ltd, Ноттингем, NG7 2QJ, Великобритания.

Очистка может быть произведена любой методикой или комбинацией таких методик как рекристаллизация, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия и (обычно) обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с использованием, к примеру, градиентного разделения в системе ацетонитрил/вода.

Анализ пептидов может быть произведен при использовании тонкослойной хроматографии, электрофореза, в частности капиллярного электрофореза, твердофазной экстракции (ТФЭ), обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, аминокислотного анализа после кислотного гидролиза и масс-спектрометрического анализа при бомбардировке быстрыми атомами (FAB), а также масс-спектрометрического анализа MALDI и ESI-Q-TOF.

В еще одном аспекте изобретения предлагается нуклеиновая кислота (например, полинуклеотид), кодирующая пептид или вариант пептида по изобретению. Полинуклеотид может быть, например, ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями, как одно-, так и/или двухнитевыми; природными или стабилизированными формами полинуклеотидов, такими как, например, полинуклеотиды с фосфоротиоатным остовом, и может содержать или не содержать интроны

при условии, что полинуклеотид кодирует пептид. Разумеется, только пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные остатки, присоединенные встречающимися в природе пептидными связями, могут кодироваться полинуклеотидом. Еще в одном аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид в соответствии с изобретением.

Был разработан ряд способов связывания полинуклеотидов, в особенности ДНК, с векторами, например, с помощью комплементарных липких концов. К примеру, к сегменту ДНК могут быть добавлены комплементарные гомополимерные хвосты для встраивания в векторную ДНК. Вектор и сегмент ДНК в таком случае соединены водородной связью между комплементарными гомополимерными хвостами, образуя молекулы рекомбинантной ДНК.

Синтетические линкеры, содержащие один или несколько сайтов рестрикции, обеспечивают альтернативный способ присоединения сегмента ДНК к векторам. Синтетические линкеры, содержащие ряд сайтов распознавания рестрикционной эндонуклеазы, имеются в продаже в различных источниках, включая International Biotechnologies Inc, Нью-Хейвен, Коннектикут, США.

Желаемый способ модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, - это использование полимеразной цепной полимеразы, как раскрыто в работе (Saiki et al., 1988)). Этот метод может быть использован для введения ДНК в подходящий вектор, например, при конструировании в подходящих сайтах рестрикции, или же он может быть использован для модификации ДНК другими пригодными путями, известными из уровня техники. Если используются вирусные векторы, то предпочтительными являются поксвирусные или аденовирусные векторы.

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящем хозяине для получения полипептида, включающего пептид или вариант по изобретению. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант по изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии

и получения полипептида по изобретению. Такие методики включают те, что раскрыты в патентах США № 4 440 859, 4 530 901, 4 582 800, 4 677 063, 4 678 751, 4 704 362, 4 710 463, 4 757 006, 4 766 075 и 4 810 648

ДНК (или в случае ретровирусных векторов – РНК), кодирующая полипептид, представляющий собой соединение по изобретению, может быть присоединена к обширному ряду других последовательностей ДНК для введения в адекватного хозяина. ДНК-спутник будет зависеть от природы хозяина, способа введения ДНК хозяину и от того, желательно ли поддержание в эписомальной или интеграционной форме.

Как правило, ДНК вводится в вектор экспрессии, такой как плазида, с соответствующей ориентацией и правильной рамкой считывания для экспрессии. Если необходимо, то ДНК может быть соединена с адекватными нуклеотидными последовательностями, обеспечивающими координацию транскрипции и трансляции, распознаваемыми желательным хозяином, хотя такие контрольные элементы обычно имеются в векторе экспрессии. Вектор вводится затем хозяину стандартными способами. Как правило, не все хозяева трансформируются вектором. Поэтому будет необходимо выделить трансформированные клетки-хозяева. Одна из методик отбора включает введение в вектор экспрессии последовательности ДНК с любыми необходимыми элементами контроля, которая кодирует выбранный признак в трансформированной клетке, такой как устойчивость к антибиотикам.

В качестве альтернативы ген для такого выбираемого признака может быть на другом векторе, который используется для совместной трансформации желаемой клетки-хозяина.

Клетки-хозяева, которые были трансформированы рекомбинантной ДНК по изобретению, культивируют затем в течение достаточного времени и при адекватных условиях, известных специалистам данной области, с учетом раскрытых в данном описании идей, что ведет к экспрессии полипептида, который после этого может быть выделен.

Известно множество систем экспрессии, включающих бактерии (например, *E. coli* и *Bacillus subtilis*), дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae*), мицелиальные грибы (например, *Aspergillus spec.*), растительные клетки, клетки животных и насекомых. Предпочтительно, чтобы система была клетками млекопитающих, такими как клетки СНО, имеющимися в наличии в Американской коллекции типов культур АТСС.

Типичная векторная плаزمида клеток млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомидин. Одним примером является pSVL, имеющимся в наличии в компании Pharmacia, Пискатеуэй, Нью-Джерси, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, также имеющийся в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии у компании Stratagene Cloning Systems, Ла Джолла, Калифорния 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (YIps) и включают дрожжевые селектируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми плазмидами с центромерами (Ycps). Основанные на промоторе векторы CMV (например, компании Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазмическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, *c-myc* или MAT. Данные слитые белки позволяют проводить выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

Сильный регуляторный участок промотора цитомегаловируса человека (CMV) повышает уровни конститутивной экспрессии белка, достигающие 1 мг/л в клетках COS. Для менее активных клеточных линий белковые уровни обычно составляют ~0,1 мг/л. Присутствие точки начала репликации SV40 будет приводить к высоким уровням репликации ДНК в перmissive клетках COS. Векторы CMV, например, могут содержать точку начала репликации pMB1 (производное pBR322) в бактериальных клетках, ген бета-лактамазы для отбора устойчивости к ампициллину у бактерий, hGH polyA, и точку начала репликации f1. Векторы, содержащие лидерную последовательность препротрипсина (PPT), могут направлять секрецию слитых белков FLAG в культуральной среде для очистки с использованием антител к FLAG, смол и чашек. Другие векторы и системы экспрессии для применения с различными клетками-хозяевами хорошо известны из уровня техники.

В другом предпочтительном варианте осуществления кодируются два или более пептида или варианта пептидов по изобретению и, таким образом, они экспрессируются последовательно (как в случае структуры типа «бусины на нити»). В этих целях пептиды или варианты пепти-

дов могут быть соединены или слиты воедино с помощью фрагментов линкерных аминокислот, таких как, например, LLLLLL, или же могут быть соединены без какого(их)-либо дополнительного(ых) пептида(ов) между ними.

Настоящее изобретение относится также к клетке-хозяину, трансформированной с помощью полинуклеотидной векторной конструкции настоящего изобретения. Клетка-хозяин может быть как прокариотической, так и эукариотической. Бактериальные клетки могут быть, предпочтительно, прокариотическими клетками-хозяевами при некоторых условиях и обычно являются штаммом *E. coli*, таким как, например, *E. coli* штамма DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Мэриленд, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типов культур ("American Type Culture Collection" (ATCC)), Роквилл, Мэриленд, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как мышь, крыса, обезьяна или человеческие фибробластные клетки и клеточные линии толстого кишечника. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в наличии в ATCC как CCL61, NIH эмбриональные клетки швейцарской мыши NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, почечные клетки обезьяны COS-1, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650 и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками почек человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфицироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в учебном пособии авторов Paulina Balbás и Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols», часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9, и другой литературе, известной специалисту данной области.

Трансформация адекватных клеток-хозяев с помощью ДНК-конструкции настоящего изобретения производится при помощи хорошо известных способов, которые обычно зависят от типа используемого вектора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, работу Cohen и соавт. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 и Sambrook и соавторы (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт. (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Также

подходит метод Бигса (Beggs) (1978) Nature 275,104-109. Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты, например, фосфат кальция и DEAE-декстран или липосомальные составы, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems или Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, США. Электропорация также подходит для трансформации и/или трансфекции клеток и хорошо известна из уровня техники для трансформации дрожжевых клеток, бактериальных клеток, клеток насекомых и клеток позвоночных.

Успешно трансформированные клетки, т.е. клетки, которые содержат конструкцию ДНК настоящего изобретения, могут быть идентифицированы хорошо известными способами, такими как ПЦР. Альтернативно наличие белка в супернатанте может выявляться с применением антител.

Следует понимать, что некоторые клетки-хозяева по изобретению подходят для получения пептидов по изобретению, например, бактериальные, дрожжевые клетки и клетки насекомых. Тем не менее, в конкретных терапевтических методах могут использоваться другие клетки-хозяева. Например, антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, могут с пользой быть использованы для экспрессии пептидов по изобретению так, что их можно будет нагружать на подходящие молекулы МНС. Таким образом, в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с изобретением.

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, в частности, дендритной клеткой или антигенпрезентирующей клеткой. АПК, нагруженные рекомбинантным слитым белком, содержащим простатическую кислотную фосфатазу (PAP), на данный момент проходят исследования в целях лечения рака предстательной железы (Sipuleucel-T) (Small et al., 2006; Rini et al., 2006).

В другом аспекте изобретения предложен способ получения пептида или его варианта; причем способ включает культивацию клетки-хозяина и выделение пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

В другом варианте осуществления пептид, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии по изобретению применяются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внутривенного (в/в) введения, подкожного (п/к) введения, внутрикожного (в/к) введения, внутрибрюшинного (в/б) введения, внутримышечного (в/м) введения. Предпочтительные способы введения пептидов включают п/к, в/к, в/б, в/в. Предпочтительные способы введения ДНК включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. Вводиться могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 мкг до 500 мкг пептида или ДНК, в зависимости от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данном диапазоне успешно использовалась в предыдущих клинических исследованиях (Walter et al Nature Medicine 18, 1254–1261 (2012)).

Другой аспект настоящего изобретения включает способ получения активированных Т-клеток *in vitro*, причем способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека, экспрессированными на поверхности подходящей антиген-презентирующей клетки на период времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом Т-клетки, где антиген является пептидом в соответствии с изобретением. Предпочтительно, если достаточное количество антигена применяется с антигенпрезентирующей клеткой.

Предпочтительно, если в клетке млекопитающих не имеется или имеется пониженный уровень или пониженная функция пептидного транспортера TAP. Подходящие клетки, в которых нет пептидного транспортера TAP, включают T2, RMA-S и клетки дрозифилы. TAP - это транспортер, связанный с процессингом антигена.

Не способная нагружать пептидом клеточная линия T2 человека имеется в наличии в American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталоговым № CRL 1992; клеточная линия дрозифилы линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталоговым № CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается в работе Karre и соавт. 1985.

Предпочтительно, если указанная клетка-хозяин до трансфекции, по существу, не экспрессирует молекулы МНС I класса. Также предпочтительно, если клетка-стимулятор экспрессирует молекулу, важную для обеспечения сигнала костимуляции для Т-клеток, такую как любая из

B7.1, B7.2, ICAM-1 и LFA 3. Последовательности нуклеиновых кислот многочисленных молекул МНС I класса и костимуляторных молекул общедоступны в банках данных GenBank и EMBL.

В случае использования эпитопа МНС I класса в качестве антигена, Т-клетки являются CD8-положительными ЦТЛ.

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92 или вариант их аминокислотной последовательности.

Для получения ЦТЛ *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, в способах, описанных в работах Peoples и соавт. (1995) и Kawakami и соавт. (1992), для получения ЦТЛ используются аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты. Plebanski и соавт. (1995) для получения ЦТЛ используют аутологичные лимфоциты периферической крови (ЛПК). Jochmus и соавт. (1997) описывают получение аутологичных ЦТЛ посредством нагрузки дендритных клеток пептидом или полипептидом на дендритные клетки или посредством инфицирования рекомбинантным вирусом. Hill и соавт. (1995) и Jerome и соавт. (1993) для получения аутологичных ЦТЛ используют В-клетки. Кроме того, для получения аутологичных ЦТЛ могут быть использованы макрофаги, нагруженные пептидом или полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. S. Walter и соавт. (2003) описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), что является также подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. В данном исследовании, иАПК были получены прикреплением предварительно полученных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микросферы) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоавидные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид иАПК должны нести другие белки с костимуляторной активностью, такие как антитела к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система часто требует добавления соответствующих растворимых факторов, к примеру, цитокинов, таких как интерлейкин-12.

При получении Т-клеток могут быть также использованы аллогенные клетки, и этот способ подробно описывается в патентной заявке WO 97/26328, включенной в контекст путем ссылки. Например, кроме клеток дрозофилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (СНО), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи, инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (1994)), в которой описывается развитие мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивная система презентации чужеродных пептидов.

Активированные Т-клетки, которые направлены против пептидов по изобретению, пригодны для терапии. Таким образом, в другом аспекте изобретения предложены активированные Т-клетки, получаемые вышеупомянутыми способами по изобретению.

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 92, предпочтительно с последовательностью с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92.

Предпочтительно, чтобы Т-клетка распознавала клетку при взаимодействии посредством ее ТКР с комплексом HLA/пептид (например, при связывании). Т-клетки пригодны для способа уничтожения клеток-мишеней у пациента, клетки-мишени которого аберрантно экспрессируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность по изобретению, где пациенту вводится эффективное число активированных Т-клеток. Т-клетки, которые введены пациенту, могут быть получены от пациента и активироваться, как описывалось выше (т.е. они являются аутологичными Т-клетками). Альтернативно Т-клетки получают не от пациента, а от другого индивида. Разумеется, предпочтительно, если индивид является здоровым индивидом. Под «здоровым индивидом» авторы изобретения имеют в виду, что индивид имеет хорошее общее состояние здоровья, предпочтительно, чтобы он имел компетентную иммунную систему и, более предпочтительно, не страдал ни одним заболеванием, которое можно легко проконтролировать и выявить.

Клетками-мишенями *in vivo* для CD8-положительных Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением могут быть клетки опухоли (которые иногда экспрессируют молекулы МНС

класса II) и/или стромальные клетки, окружающие опухоль (опухолевые клетки) (которые иногда также экспрессируют молекулы МНС класса II); (Dengjel et al., 2006)).

Т-клетки настоящего изобретения могут быть использованы в качестве активных ингредиентов в терапевтической композиции. Таким образом, в изобретении предложен также способ уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени aberrантно экспрессируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность по изобретению, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, как определено выше.

Под понятием «aberrантно экспрессированный» изобретатели подразумевают также, что полипептид экспрессирован в избытке по сравнению с нормальными уровнями экспрессии, или что ген является «молчащим» в ткани, из которой образовалась опухоль, однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием «экспрессирован в избытке» изобретатели понимают, что полипептид представлен на уровне, который, по меньшей мере, в 1,2 раза выше уровня, представленного в нормальной ткани; предпочтительно, по меньшей мере, в 2 раза и, более предпочтительно, по меньшей мере, в 5 или 10 раз выше уровня, представленного в нормальной ткани.

Т-клетки могут быть получены способами, известными из уровня техники, к примеру, теми, что описаны выше.

Протоколы для этого так называемого адоптивного переноса Т-клеток хорошо известны из уровня техники. Вкратце с ними можно ознакомиться в (Gattinoni et al., 2006) и (Morgan et al., 2006).

Любая молекула по изобретению, т.е. пептид, нуклеиновая кислота, антитело, вектор экспрессии, клетка, активированные ЦТЛ, Т-клеточный рецептор или нуклеиновая кислота, кодирующая его, пригодна для лечения нарушений, характеризующихся клетками, ускользающими от иммунного ответа. Поэтому любая молекула настоящего изобретения может применяться в качестве лекарственного средства или при изготовлении лекарственного средства. Молекула может быть использована сама по себе или в комбинации с другой(ими) молекулой(ами) по изобретению или известной(ыми) молекулой(ами).

Предпочтительно, если лекарственное средство настоящего изобретения является вакциной. Она может вводиться непосредственно пациенту, в пораженный орган или системно в/к, в/м, п/к, в/б и в/в или вноситься *ex vivo* в клетки, полученные от пациента, или в человеческую клеточную линию, которые затем могут вводиться пациенту или использоваться *in vitro* для селекции субпопуляции из иммунных клеток, полученных от пациента, которые после этого вновь вводятся пациенту. Если нуклеиновая кислота введена в клетки *in vitro*, то может быть полезно, чтобы клетки были трансфицированными, чтобы совместно экспрессировать иммуностимулирующие цитокины, такие как интерлейкин-2. Пептид может быть, по существу, чистым или комбинированным с иммуностимулирующим адьювантом (см. ниже) или использоваться в комбинации с иммуностимулирующими цитокинами или же вводиться с подходящей системой доставки, например, липосомами. Пептиды могут быть также конъюгированы с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. патентную заявку WO 95/18145 и Longenecker, 1993). Пептид может быть также меченым или может быть слитым белком или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем изобретении, как ожидается, стимулируют CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки. Тем не менее, стимуляция CD8⁺ ЦТЛ более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов МНС I класса, которые стимулируют CD8⁺ ЦТЛ, партнеры в слиянии или участки гибридной молекулы надлежащим образом предоставляют эпитопы, которые стимулируют CD4-положительные Т-клетки. CD4- и CD8-стимулирующие эпитопы хорошо известны из уровня техники и включают те, что были идентифицированы в настоящем изобретении.

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No 92, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

В другом аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность, с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 65 и с SEQ ID No. 76 по SEQ ID No. 84 и SEQ ID No. 92, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от

двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

Полинуклеотид может быть, по существу, чистым или содержаться в подходящем векторе или системе доставки. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, кДНК, ПНК, ЦНК, РНК или их комбинацией. Методы конструирования и введения такой нуклеиновой кислоты хорошо известны из уровня техники. Обзор представлен, например, в (Pascolo et al., 2005). Полинуклеотидные вакцины просто получить, однако механизм действия этих векторов по индуцированию иммунного ответа понятен не полностью. Подходящие векторы и системы доставки включают вирусные ДНК и/или РНК, такие как системы, которые основаны на аденовирусе, вирусе осповакцины, ретровирусах, вирусе герпеса, аденоассоциированном вирусе или гибридах, содержащих элементы более чем одного вируса. Невирусные системы доставки включают катионные липиды и катионные полимеры и хорошо известны из уровня техники в области доставки ДНК. Также может быть использована физическая доставка, такая как посредством «ген-пистолета». Пептид или пептиды, кодируемые нуклеиновой кислотой, могут быть слитым белком, например, с эпитопом, который стимулирует Т-клетки против соответствующего противоположного определяющего комплементарность участка CDR, как описывается выше.

Лекарственное средство по изобретению может также включать один или более адьювантов. Адьюванты – это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные ЦТЛ или хелперными Т-клетками (Т_H) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в лекарственном средстве настоящего изобретения. Подходящие адьюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, Amplivax®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии «вода в масле» и «масло в воде», ОК-432, ОМ-174, ОМ-197-МР-ЕС, ONTAK, OspA, векторная система PepTel®, основанные на полилактид-ко-гликолиде

[PLG] и декстране микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонины, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъюванты, такие как Detox компании Ribi, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995; Allison and Krummel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотнесены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF- α), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5 849 589, специально включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, IFN-альфа, IFN-бета) (Gabrilovich 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации T_{H1} -клеток и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи CD4 Т-клеток. Активация T_{H1} , вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации T_{H2} . CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG в некоторых

экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 В1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двуцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции настоящего изобретения. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как РНК, связывающаяся с TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9.

Другие примеры пригодных к использованию адъювантов включают, но без ограничения, химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги dsРНК, такие как поли-(I:C) и их производные (например, AmpliGen®, Hiltonol®, поли-(ICLC), поли(IC-R), поли(I:C12U), бактериальные ДНК или РНК, отличные от CpG, а также иммуноактивные малые молекулы и антитела, такие как циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб®, целебрекс, NCX-4016, силденафил, тадалафил, варденафил, сорафениб, темозоломид, темсиролимус, XL-999, CP-547632, пазопаниб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4, другие антитела, нацеленные на основные структуры иммунной системы (например, антитела к CD40, TGFбета, рецептору TNFальфа) и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или как адъюванты. Количества и концентрации адъювантов и добавок, пригодных для использования в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены опытным специалистом без проведения излишних экспериментов.

Предпочтительными адъювантами являются имиквимод, резиквимод, ГМ-КСФ, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, интерферон-альфа, CpG олигонуклеотиды и их производные, поли-(I:C) и ее производные, РНК, силденафил и составы из твердых микрочастиц с PLG или виросомы.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод, резиквимод и интерферон-альфа.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов,

таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод и резиквимод.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адьювантом является циклофосфамид, имиквимод или резиквимод.

Еще более предпочтительными адьювантами являются монтанид IMS 1312, монтанид ISA 206, монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и моноклональные антитела к CD40 или их комбинации.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутримышечное, внутривенное или оральное введение. Для этого пептиды и – факультативно – другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные агенты, разбавители, ароматизаторы, смазывающие вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены вместе с иммуностимулирующими веществами, такими как цитокины. Обширный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, можно найти, например, в работе A. Kibbe, «Handbook of Pharmaceutical Excipients», 3rd Ed., 2000, изд. «American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press». Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и/или лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Примеры составов могут быть взяты, например, из EP2113253.

Тем не менее, в зависимости от количества физико-химических свойств пептидов по изобретению необходимо проведение дальнейших исследований, чтобы предложить составы конкретных комбинаций пептидов, в особенности комбинации из более чем 20 пептидов, которые были бы стабильны в течение свыше 12 – 18 месяцев.

В настоящем изобретении предложено лекарственное средство, которое пригодно для лечения рака, в частности немелкоклеточной карциномы легких, рака желудка, почечно-клеточной карциномы, рака толстой кишки, аденокарциномы, рака предстательной железы, доброкачественных новообразований и злокачественной меланомы.

В настоящем изобретении также предложен комплект, включающий:

- (а) контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, как описанная выше, в виде раствора или в лиофилизированной форме;
- (б) факультативно – второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава; и
- (в) факультативно – инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению раствора и/или по применению лиофилизированного состава.

Кроме того, комплект может также включать один или более (iii) буферов, (iv) разбавителей, (v) фильтров, (vi) игл или (vii) шприцев. Контейнер является, предпочтительно, бутылкой, флаконом, шприцем или пробиркой; и он может быть контейнером многократного применения. Фармацевтическая композиция предпочтительно является лиофилизированной.

Комплект согласно настоящему изобретению предпочтительно включает лиофилизированный состав настоящего изобретения в подходящем контейнере и инструкции для его восстановления и/или по его применению. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть изготовлен из разных материалов, таких как стекло или пластмасса. Предпочтительно, если комплект и/или контейнер содержит(ат) инструкции по применению контейнера или связанные с ним инструкции, которые дают указания по восстановлению и/или применению. Например, на этикетке может быть указано, что лиофилизированный состав должен быть восстановлен до таких концентраций пептидов, как описано выше. На этикетке далее может быть указано, что состав применяется или предназначается для подкожного введения.

Контейнер с составом может быть флаконом многократного использования, который позволяет повторное введение (например, от 2-6 введений) восстановленного состава. Комплект может дополнительно включать второй контейнер, включающий подходящий разбавитель (например, раствор бикарбоната натрия).

После смешивания разбавителя и лиофилизированного состава окончательная концентрация пептида в восстановленном составе составляет, предпочтительно по меньшей мере 0,15 мг/мл/пептида (=75 мкг) и, предпочтительно, не более чем 3 мг/мл/пептида (=1500 мкг). Комплект может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и с

точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Комплекты по настоящему изобретению могут включать один контейнер, который содержит фармацевтический состав в соответствии с настоящим изобретением с другими компонентами или без них (например, других соединений или фармацевтических композиций этих других соединений) или может иметь отдельные контейнеры для каждого компонента.

Комплект по изобретению предпочтительно включает состав по изобретению, упакованный для применения в комбинации с совместным введением второго соединения (такого как адъюванты (например, ГМ-КСФ), химиотерапевтического средства, природного продукта, гормона или антагониста, средства против ангиогенеза или ингибитора ангиогенеза; апоптоз-индуцирующего средства или хелатора) или их фармацевтической композиции. Компоненты комплекта до введения пациенту могут быть предварительно смешаны, или же каждый компонент может находиться в отдельном контейнере. Компоненты комплекта могут быть предоставлены в виде одного или нескольких жидких растворов, предпочтительно, водного раствора, более предпочтительно, стерильного водного раствора. Компоненты комплекта также могут быть предоставлены в виде твердой формы, которая может быть превращена в жидкость при добавлении подходящих растворителей, которые, предпочтительно, предоставляются в другом, отдельном, контейнере.

Контейнер терапевтического комплекта может быть флаконом, пробиркой, колбой, бутылкой, шприцем или любыми другими средствами, заключающими в себе твердое вещество или жидкость. Обычно, если имеется более одного компонента, комплект содержит второй флакон или другой контейнер, что позволяет произвести отдельную дозировку. Комплект может также содержать другой контейнер для фармацевтически приемлемой жидкости. Лечебный комплект будет предпочтительно содержать аппарат (например, одну или более игл, шприцы, глазные пипетки, пипетки и т.д.), который обеспечивает введение веществ по изобретению, которые являются компонентами настоящего комплекта.

Настоящий состав подходит для введения пептидов любым приемлемым способом, таким как оральный (энтеральный), назальный, глазной, подкожный, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный или чрескожный способ. Предпочтительно, чтобы введение было п/к и, наиболее предпочтительно, в/к. Введение может производиться инфузионным насосом.

Так как пептиды по изобретению были выделены из клеток НМРЛ, лекарственное средство по изобретению предпочтительно используется для лечения НМРЛ. В предпочтительном варианте осуществления поскольку пептиды по изобретению были получены из клеток АВСА13 и ММР12, и они были выделены из НМРЛ, лекарственное средство по изобретению предпочтительно используется для лечения НМРЛ.

Пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 78 по 92 были также выделены из карциномы клеток Меркеля и, таким образом, могут быть использованы для лечения карциномы клеток Меркеля.

Теперь настоящее изобретение будет описано с помощью последующих примеров, которые описывают его предпочтительные варианты осуществления, тем не менее, не ограничивая ими изобретение. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Пример масс-спектра АВСА13-001, демонстрирующий его презентацию на образце первичной опухоли NSCLC898. Анализ с помощью ЖХ-МС с системой ионизации в наноэлектроспрее (NanoESI-LCMS) производили на пептидном пуле, элюированном из образца ткани НМРЛ 898. Масс-хроматограмма для m/z $543,8318 \pm 0,001$ Да, $z = 2$ показывает пик пептида со временем удержания 86,36 мин. В) Выявленный пик на масс-хроматограмме при 86,36 мин обнаружен сигналом для m/z 543,8318 на масс-спектре. С) Индуцированный столкновением масс-спектр затухания сигнала выбранного предшественника m/z 543,8318, записанный при эксперименте nanoESI-LCMS при заданном времени удержания, подтвердил присутствие АВСА13-001 в опухолевом образце NSCLC898. D) Картина фрагментации синтетического контрольного пептида АВСА13-001 записывали и сравнивали с полученными картинками фрагментации природных пептидов TUMAP, представленных в Фиг. С для верификации последовательности.

Фигура 2: Профили экспрессии мРНК выбранных белков в нормальных тканях и 21 образцах тканей рака легкого

а) АВСА13 (Идентификатор набора проб: 1553605_a_at)

b) MMP12 (Идентификатор набора проб: 204580_s_at)

Фигура 3: Профили презентации выбранных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса. Профиль презентации был подсчитан для каждого пептида, показывая средний уровень презентации в образце, а также варианты репликации. В профиле сравниваются образцы опухолевой формы, представляющей интерес, с фоновым уровнем образцов нормальной ткани.

a) ABCA13-001

b) DST-001

c) MXRA5-001

Фигура 4: Типичные результаты пептид-специфической иммуногенности *in vitro* пептидов TUMAP, образующих комплексы с молекулами HLA I класса. Специфические CD8⁺ Т-клетки окрашивали мультимерами HLA, помеченными двумя разными флуорохромами. На точечных графиках показаны популяции клеток с положительным окрашиванием обоими красителями, связанными с MHC-мультимерами для стимуляции пептида (левые секции) и стимуляции соответствующих пептидов отрицательного контроля (правые секции).

Фигура 5: Свойства связывания POSTN-002 и MMP12-002 с исследованными гаплотипами HLA: На графике приведены показатели связывания POSTN-002 и MMP12-002 с 5 из 7 проанализированных гаплотипов HLA-DR.

Фигура 6: Стабильность комплексов HLA-POSTN-002 и MMP12-002 в течение 24 ч при 37°C: На графике показано процентное соотношение интактных комплексов HLA-POSTN-002 и HLA-MMP12-002 после выдержки в течение 24 ч при 37°C с соответствующей молекулой HLA.

Фигура 7: Примеры CD4 Т-клеточного ответа на введение вакцины против SEA-006, выявленного методом внутриклеточного окрашивания (ICS) II класса. После сенсibilизации *in vitro* МКПК пациента 36-031 были проанализированы на наличие CD4 Т-клеточных ответов на SEA-006 (верхняя часть) и на имитатор (нижняя часть) во временной точке, совпадающей для Визита 8 и EOS. Клетки были простимулированы соответствующими пептидами и окрашены маркерами жизнеспособности, антителами к CD3, антителами к CD8, антителами к CD4 и эф-

факторными маркерами (справа налево: CD154, TNF-альфа, IFN-гамма, ИЛ-2, ИЛ-10), соответственно. Для жизнеспособных Т-клеток CD4 анализировали долю клеток, положительных для одной или нескольких эффекторных молекул.

Фигура 8: Иммуногенность различных пептидов II класса: График показывает показатели иммунных ответов на 5 различных пептидов II класса, выявленных у 16 пациентов в ответ на стимуляцию пептидами IMA950 и у 71 пациента в ответ на стимуляцию пептидами IMA910 с помощью ICS.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Идентификация и количественный анализ опухолеассоциированных пептидов, презентуемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были предоставлены Университетом г. Гейдельберг, Германия. Перед проведением хирургического вмешательства было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после операции ткани были подвергнуты шоковой заморозке в жидком азоте и хранились до выделения TUMAP-пептидов при -80°C .

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

Пулы пептидов HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были получены методом иммунопреципитации из плотных тканей в соответствии с незначительно измененным протоколом (Falk, K. et al 1991; Seeger, F.H.T. 1999) при использовании HLA-A*02-специфического антитела BB7.2 или HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

Методы

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазовой хроматографией (Acquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридном масс-спектрометре LTQ-Orbitrap (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую мик-

рокапиллярную колонку из плавленого кварца (75 мкм в/д x 250 мм) с обратнофазным материалом 1,7 мкм C18 (Waters) с применением скорости потока в 400 нл в минуту. Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10% до 33% растворителя В при скорости потока 300 нл в минуту. Градиент был составлен из растворителя А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворителя В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник наноESI. Масс-спектрометр LTQ-Orbitrap работал в информационно-зависимом режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на спектрометре Orbitrap ($R = 30\ 000$), за чем следовало сканирование MS/MS на Orbitrap ($R = 7500$) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Тандемные масс-спектры интерпретировали при помощи программы SEQUEST с дополнительным ручным управлением. Идентифицированную пептидную последовательность подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью. На Фиг. 1 представлен образец спектра, полученный из опухолевой ткани для пептида ABCA13-001, ассоциированного с МНС класса I, и его профиля элюции на системе UPLC.

Относительный количественный анализ методом ЖХ/МС без изотопных меток проводили путем подсчета ионов, т. е. с помощью экстракции и анализа характеристик ЖХ/МС (Mueller et al. 2007a). Этот метод основан на предположении, что площадь пика ЖХ/МС пептида коррелирует с его концентрацией в образце. Извлеченные характеристики обрабатывали с помощью деконволюционного анализа состояния заряда и путем выравнивания времени удерживания (Mueller et al. 2007b; Sturm et al. 2008). Наконец, все характеристики спектров ЖХ/МС были сопоставлены методом перекрестных ссылок с результатами по идентификации последовательности, чтобы объединить количественные данные различных образцов и тканей в профили презентации пептидов. Количественные данные были нормализованы с применением двухуровневой системы в соответствии с центральной тенденцией с целью учета вариабельности внутри технических и биологических репликатов. Таким образом, каждый идентифицированный пептид может быть ассоциирован с количественными данными, позволяющими провести относительную количественную оценку образцов и тканей. Кроме того, все количественные данные, полученные для пептидов-кандидатов, были проконтролированы вручную в целях обеспечения взаимосогласованности данных и для проверки точности автоматиче-

ского метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариабельность репликатов. В профиле сравниваются образцы НМРЛ с фоновым уровнем образцов нормальной ткани.

Профили презентации отдельных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на Фигуре 3.

ПРИМЕР 2:

Профили экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

Не все пептиды, идентифицированные как презентуемые на поверхности опухолевых клеток молекулами МНС, подходят для иммунотерапии, потому что большинство этих пептидов получены из нормальных клеточных белков, экспрессируемых многими видами клеток. Только немногие из этих пептидов являются опухолеассоциированными и, скорее всего, способны индуцировать Т-клетки с высокой специфичностью распознавания опухоли, из которой они были образованы. В целях идентификации таких пептидов и минимизации риска аутоиммунитета, вызванной вакцинацией, изобретатели концентрировали свое внимание на тех пептидах, которые получены из белков, экспрессированных в избытке на опухолевых клетках в сравнении с большинством нормальных тканей.

Идеальный пептид будет получен из белка, являющегося уникальным для опухоли и не присутствующего ни в одной другой ткани. Для идентификации пептидов, которые получены из генов с профилем экспрессии, похожим на идеальный, идентифицированные пептиды соотносили с белками и генами, из которых они были получены и которые их кодируют, соответственно, и построены профили экспрессии этих генов.

Источники и приготовление РНК

Хирургически удаленные тканевые препараты были предоставлены Университетом г. Гейдельберг, Германия (см. Пример 1) после получения письменной формы информированного согласия от каждого пациента. Препараты опухолевой ткани были мгновенно заморожены в жидком азоте после операции и впоследствии гомогенизированы с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Суммарная РНК была приготовлена из данных образцов с использованием реагента TRI (Ambion, Дармштадт, Германия) с последующей очисткой на RNeasy (QIAGEN,

Хильден, Германия); оба метода осуществлялись в соответствии с указаниями производителей.

Суммарная РНК здоровых человеческих тканей была куплена (Ambion, Хантингтон, Великобритания; Clontech, Гейдельберг, Германия; Stratagene, Амстердам, Нидерланды; BioChain, Хейард, Калифорния, США). РНК нескольких индивидов (от 2 до 123 индивидов) была смешана таким образом, что РНК каждого индивида имела равный вес.

Качество и количество образцов суммарной РНК оценивали на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Вальдбронн, Германия) с использованием набора RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Эксперименты с микрочипами

Анализ экспрессии генов всех образцов РНК из опухолевой и нормальной ткани был произведен с помощью олигонуклеотидных микрочипов Affymetrix Human Genome (HG) U133A или HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Санта Клара, Калифорния, США). Все этапы были выполнены в соответствии с руководством Affymetrix. Вкратце, двухнитевую кДНК синтезировали из 5–8 мкг суммарной РНК с использованием SuperScript RTII (Invitrogen) и олиго-dT-T7 праймера (MWG Biotech, Эберсберг, Германия), как описывается в руководстве. Транскрипцию *in vitro* производили с использованием набора для мечения РНК-транскриптов BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фармингейл, Нью-Йорк, США) для чипов U133A или набора GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипов U133 Plus 2.0 с последующей фрагментацией, гибридизацией кРНК и окрашиванием стрептавидин-фикоэритрином и биотинилированным антистрептавидиновым антителом (Molecular Probes, Лейден, Нидерланды). Изображения сканировали на Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) или Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), а данные анализировали в программе GCOS (Affymetrix) с использованием настроек по умолчанию для всех параметров. Для нормализации использовались 100 служебных генов, предоставленных Affymetrix. Относительные значения экспрессии были подсчитаны из отношений зарегистрированных сигналов, полученных компьютерной программой, а значение для образца нормальной почки было произвольно задано значением 1,0.

Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или эксклюзивно экспрессированы в клетках немелкоклеточной карциномы легкого, представлены на Фиг. 2.

ПРИМЕР 4:

Иммуногенность *in vitro* для пептидов НМРЛ, презентруемых МНС I класса

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению были проведены исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8⁺ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом могла быть показана иммуногенность для пока что 9 рестриктированных по HLA-A*0201 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8⁺ Т-клетки-предшественники (Таблица 4).

Прайминг CD8⁺ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексом пептид-МНС (рМНС) и антителом к CD28, авторы сначала выделили CD8⁺ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы согласия) из Отделения трансфузиологии г. Тюбингена, Германия.

Выделенные CD8⁺ лимфоциты или МКПК инкубировали до использования в Т-клеточной среде (ТСМ), состоящей из RPMI-Glutamax (Invitrogen, Карлсруэ, Германия) с добавлением 10% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки АВ (PAN-Biotech, Эйденбах, Германия), 100 Ед/мл пенициллина / 100 мкг/мл стрептомицина (Cambrex, Кёльн, Германия), 1 мМ пирувата натрия (CC Pro, Обердорла, Германия) и 20 мкг/мл гентамицина (Cambrex). 2,5 нг/мл ИЛ-7 (PromoCell, Гейдельберг, Германия) и 10 Ед/мл ИЛ-2 (Novartis Pharma, Нюрнберг, Германия) также добавляли на этом этапе в среду ТСМ.

Получение микросфер, покрытых рМНС и антителами к CD28, стимуляции Т-клетками и считывание производили на хорошо охарактеризованной системе *in vitro*, используя четыре различные молекулы рМНС для каждого цикла стимуляций и 8 различных молекул рМНС для каждого цикла считывания.

Все комплексы рМНС, использованные для нагружения иАПК, и считывание данных цитометра были получены методом обмена МНС-лигандами под воздействием УФ-излучения (Rodenko et al., 2006) с минимальными изменениями. В целях определения количества мономера рМНС, полученного при обмене, проводили анализы с помощью сэндвич-варианта ELISA в соответствии с (Rodenko et al., 2006).

Очищенный костимуляторный IgG2a мыши к антителам человека CD28 Ab 9.3 (Jung et al., 1987) был химически биотинилирован с использованием сульфо-N-гидроксисукцинимидо-биотина, как рекомендуется изготовителем (Perbio, Бонн, Германия). Использованные микросферы представляли собой полистироловые частицы размером 5,6 мкм, покрытые стрептавидином (Bangs Laboratories, Иллинойс, США).

рМНС, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVNI из DDX5), соответственно.

800 000 микросфер / 200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии 4 x 12,5 нг другого биотинилированного комплекса рМНС, промывали и затем добавляли 600 нг биотинилированных антител к CD28 в объеме 200 мкл. Стимуляцию проводили в 96-луночных планшетах путем совместной инкубации 1×10^6 CD8+ Т-клеток с 2×10^5 промытых покрытых микросфер в 200 мкл среды TCM с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3-4 дней при 37°C. Половина среды была затем заменена на свежую среду TCM с добавлением 80 Ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 3-4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с рМНС-мультимеров использовали 8 различных молекул рМНС на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012) с незначительными изменениями, относящимися к мечению с 5 различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ,

Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия) и мультимерами рМНС с флуоресцентными метками. Для анализа использовали цитометр BD LSRII SORP, снабженный подходящими лазерами и фильтрами. Пептид-специфические клетки были подсчитаны как процентная доля от всех CD8+ клеток. Оценку результатов анализа мультимеров проводили с помощью программы FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Прайминг *in vitro* специфических мультимер-положительных CD8+ лимфоцитов оценивали сравнением со стимуляциями отрицательного контроля. Иммуногенность для заданного антигена была определена, если было обнаружено, что по меньшей мере в одной подлежащей оценке простимулированной *in vitro* лунке одного здорового донора содержалась специфическая CD8+ Т-клеточная линия после стимуляции *in vitro* (т.е. когда данная лунка содержала по меньшей мере 1% специфичных мультимер-положительных среди CD8-положительных Т-клеток и процентная доля специфичных мультимер-положительных клеток была по меньшей мере в 10 раз выше медианного значения стимуляций отрицательного контроля).

Иммуногенность *in vitro* для пептидов НМРЛ

Для проанализированных пептидов HLA I класса, иммуногенность *in vitro* могла быть продемонстрирована генерированием пептид-специфических Т-клеточных линий. Отдельные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимеров для двух пептидов по изобретению показаны на Фиг. 4 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 25 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 5.

Таблица 5: Иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса *in vitro*.

Отдельные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для пептидов по изобретению. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 70 % = +++; и > 70 % = ++++

SEQ ID NO:	Лунки	Доноры
1	+	++
2	+	++
3	+	++
4	+	++
7	++	++++
8	+	++

9	+	+
10	+	++
11	++	++++ (100%)
15	++	++
16	+	++
19	+	++
18	+	+++
21	++	++
22	+	+++
24	+	++
30	+	++
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	+	++

ПРИМЕР 5:

Синтез пептидов

Все пептиды были синтезированы стандартным и общепринятым методом твердофазного синтеза пептидов с использованием Fmoc-методики. После очистки препаративной ОФ ВЭЖХ (обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией) проводилась процедура обмена ионов для внедрения физиологически совместимых противоионов (например, трифторацетата, ацетата, аммония или хлорида).

Идентичность и чистоту каждого отдельного пептида определяли с помощью масс-спектрометрии и аналитической ОФ ВЭЖХ. После процедуры обмена ионов были получены пептиды в виде белого или грязно-белого лиофилизата со степенью чистоты от 90% до 99,7%.

Все пептиды TUMAP предпочтительно вводят в виде солей трифторацетатов или ацетатов, возможны также другие солевые формы. Для проведения измерений примера 4 были использованы пептиды в виде трифторацетатов.

ПРИМЕР 6:

Реакция обмена лигандами под воздействием УФ-излучения

Пептиды-кандидаты для вакцины в соответствии с настоящим изобретением далее проходили испытание на иммуногенность с помощью исследования прайминга *in vitro*. Отдельные комплексы пептида и молекулы МНС, необходимые для этого исследования, были получены с помощью реакции обмена лигандами под воздействием УФ-излучения, при которой УФ-чувствительный пептид расщепляется под воздействием УФ-излучения и анализируется продукт обмена с интересующим пептидом. Только пептиды-кандидаты, которые могут эффективно связываться и стабилизировать восприимчивые к пептиду молекулы МНС, предотвращают диссоциацию комплексов с МНС. Для определения выхода продукта реакции обмена проводили анализ методом ELISA на основе обнаружения легкой цепи ($\beta 2m$) стабилизированных комплексов с МНС. Этот анализ производили, в основном, как описано у Rodenko и соавт. (Rodenko B, Toebes M, Hadrup SR, van Esch WJ, Molenaar AM, Schumacher TN, Ovaa H. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. Nat Protoc. 2006;1(3):1120-32.).

В 96-луночные планшеты MAXISorp (NUNC) на ночь вносили 2 мкг/мл стрептавидина в PBS при комнатной температуре, промывали 4 раза и блокировали в течение 30 мин при 37°C в 2% BSA, содержащем блокирующий буфер. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*0201/MLA-001 служили в качестве стандарта, покрывающего диапазон 8-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-МНС после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл пероксидазы хрена, конъюгированной с антителом к $\beta 2m$, снова промывали и проводили обнаружение

с помощью раствора ТМБ; реакцию останавливали NH_2SO_4 . Величину поглощения измеряли при длине волны 450 нм.

Таблица 6: Реакция обмена лигандами под воздействием УФ-излучения

SEQ NO.	ID	Название пеп-тида	Средний выход реакции обмена в %	Выход реакции обмена
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	+++
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	++++
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	++++

Пептиды-кандидаты, которые демонстрировали высокий выход реакции обмена (т.е. более 40%, предпочтительно более 50%, более предпочтительно более 70% и, наиболее предпочтительно, более 80%) обычно являются предпочтительными для генерирования и получения антител или их фрагментов и/или Т-клеточных рецепторов или их фрагментов, поскольку они проявляют достаточную avidность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

ПРИМЕР 7:

Связывание и иммуногенность выбранных пептидов МНС II класса

Белки HLA II класса подразделяют на 3 основные изоформа HLA-DR, -DP и DQ, которые кодируются многочисленными гаплотипами. Комбинация различных α - и β -цепей увеличивает разнообразие белков HLA II класса, обнаруженных в произвольной популяции. Таким образом, выбранные пептиды TUMAP HLA II класса должны связываться с несколькими различными молекулами HLA-DR (т. е. проявлять способность к промискуитетному связыванию), чтобы быть в состоянии способствовать эффективному Т-клеточному ответу у значимой процентной доли пациентов.

Промискуитетное связывание POSTN-002 и MMP12-002 с различными гаплотипами HLA-DR и стабильность образованных комплексов оценивались сторонним поставщиком услуг с помощью анализа связывания *in vitro*, как описано далее.

Материалы и Методы

Список пептидов

№ последовательности	Ид. № пептида	Последовательность	Источник	Размер
76	MMP12-002	INNYTPDMNREDVDYAIR	IMA-942	18
77	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	IMA-942	17

Список исследованных гаплотипов HLA-DR

7 исследованных гаплотипов HLA-DR выбраны в соответствии с их частотой встречаемости в HLA-A*02 и HLA-A*24-положительной популяции североамериканцев (Таблица 7.1 и 7.2)

Данные получены из HLA-типизирования 1,35 миллиона добровольцев, зарегистрированных в Национальной программе донорства костного мозга (Mori et al., 1997). Анализируемая популяция была подразделена на следующие этнические группы: Американцы европеоидной расы (N=997 193), афроамериканцы (N=110 057), монголоиды (N=81 139), латиноамериканцы (N=100 128) и коренные американцы (индейцы) (N=19 203).

Таблица 7.1 Частота гаплотипа у HLA-A*02-положительных североамериканцев: Анализируемые гаплотипы выделены серым цветом.

Серологический гаплотип		Частота встречаемости гаплотипа [% HLA-A*02-положительных лиц]				
HLA-A	HLA-DR	Европейская раса	Африканцы	Монголоиды	Латиноамериканцы	Коренные американцы
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
ВСЕГО		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Таблица 7.2 Частота гаплотипа у HLA-A*24-положительных североамериканцев: Анализируемые гаплотипы выделены серым цветом.

Серологический гаплотип		Частота встречаемости гаплотипа [% HLA-A*24-положительных лиц]				
HLA-A	HLA-DR	Европейская раса	Африканцы	Монголоиды	Латиноамериканцы	Коренные американцы
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
ВСЕГО		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Принципы испытания

Анализ связывания МНС с пептидом при помощи методики REVEAL[®] компании ProImmune определяет способность каждого пептида-кандидата связываться с молекулой HLA II класса выбранного гаплотипа и стабилизировать комплекс HLA-пептид. Для этого пептиды-кандидаты собраны *in vitro* с конкретным белком HLA II класса. Уровень слития пептида с молекулами HLA измеряют оценкой присутствия или отсутствия естественной конформации собранного комплекса HLA-пептид во временной точке 0 после завершения процедуры рефолдинга (т. н. скорость ассоциации «on-rate»).

Способность пептидов-кандидатов связываться с конкретной молекулой HLA сравнивают со значением для молекулы, о которой известно, что она имеет очень сильную способность к связыванию (положительный контроль), присваивая в результате соответствующие показатели связывания МНС и пептида по методике REVEAL[®]. Пептид положительного контроля выбран и предоставлен компанией ProImmune, исходя из ее опыта для каждого гаплотипа HLA в отдельности.

Помимо аффинности пептида к конкретной молекуле HLA длительная стабильность образованного комплекса HLA-пептид является основополагающей для появления иммунного ответа. В соответствии с этим присутствие образованного комплекса HLA-пептид измеряли после его инкубирования в течение 24 ч при 37°C. Следовательно, стабильность образованных комплексов МНС-пептид рассчитывали как процентное соотношение показателей связывания по прошествии 24 ч и показателей связывания, полученных сразу же после процесса рефолдинга (в соответствии с точкой 0).

Результаты

Анализ POSTN-002 и MMP12-002 в рамках анализа силы связывания по методике REVEAL[®] комплекса МНС-пептид показал, что оба пептида связываются с HLA различных гаплотипов. Как было продемонстрировано, POSTN-002 образует комплекс с 5 и MMP12-002 с 4 из 7 исследованных HLA-гаплотипов (Фигура 5). Ни один из этих двух пептидов не связывается ни с HLA-DR3, ни HLA-DR6. Установленные показатели связывания находились в диапазоне от 0,02 до приблизительно 2,5% в сравнении с положительным контролем, и были отчетливо выше показателей для несвязывающихся пептидов.

Анализ стабильности образованных комплексов HLA-POSTN-002 и HLA-MMP12-002 показал, что 3 и 2 из 6 исследованных комплексов HLA-пептид были стабильны спустя 24 ч при 37°C, соответственно (Фигура 6).

Заключение об иммуногенности пептида на основании его способности к связыванию с молекулой HLA может быть сделано путем сравнения показателей связывания этого пептида с другим, иммуногенность которого известна. Поэтому для этого сравнения были выбраны пять хорошо исследованных пептидов с уже определенной иммуногенностью. Иммуногенность этих пептидов была определена *ex vivo* в образцах крови иммунизированных пациентов с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинами (ICS) CD4 T-клеток.

В принципе, анализы ICS исследуют качество конкретных T-клеток в отношении эффекторных функций. Поэтому мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) культивировали *in vitro*, а затем рестимулировали исследуемым пептидом, контрольным пептидом и отрицательным контролем (здесь: ИМИТАТОР). После этого рестимулированные клетки окрашивали для выявления выработки FN-гамма, TNF-альфа, ИЛ-2 и ИЛ-10, а также экспрессии костимуляторной молекулы CD154. Подсчет подвергшихся воздействию клеток производили на проточном цитометре (Фигура 7).

Анализ иммуногенности показал 100%-ый ответ иммунной системы при иммунизации пептидами IMA950 (BIR-002 и MET-005) у 16 пациентов и от 44% до 86% ответов иммунной системы на иммунизацию пептидами IMA910 (CEA-006, TGFBI-004 и MMP-001) у 71 пациентов.

Для сравнения показателей связывания POSTN-002 и MMP12-002 с показателями связывания пептидов IMA910 и IMA950 все пептиды были сгруппированы в таблицу для каждого исследованного гаплотипа HLA-DR в соответствии с установленными показателями связывания (Таблицы 8.1 – 8.5).

Таблица 81. Показатели связывания POSTN-002 и MMP12-002 с HLA-DR1 в сравнении с показателями связывания пептидов с известной иммуногенностью с молекулами МНС II класса: POSTN-002 и MMP12-002 выделены серым цветом.

Ранг пептида	Код пептида	Источник	Относительный показатель связывания 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

Таблица 8.2 Показатели связывания POSTN-002 и MMP12-002 с HLA-DR2 в сравнении с показателями связывания пептидов с известной иммуногенностью с молекулами МНС II класса: POSTN-002 и MMP12-002 выделены серым цветом.

Ранг пептида	Код пептида	Источник	Относительный показатель связывания 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

Таблица 8.3 Показатели связывания POSTN-002 и MMP12-002 с HLA-DR4 в сравнении с показателями связывания пептидов с известной иммуногенностью с молекулами МНС II класса: POSTN-002 и MMP12-002 выделены серым цветом.

Ранг пептида	Код пептида	Источник	Относительный показатель связывания 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

Таблица 8.4 Показатели связывания POSTN-002 и MMP12-002 с HLA-DR5 в сравнении с показателями связывания пептидов с известной иммуногенностью с молекулами МНС II класса: POSTN-002 и MMP12-002 выделены серым цветом.

Ранг пептида	Код пептида	Источник	Относительный показатель связывания 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

Таблица 8.5 Показатели связывания POSTN-002 и MMP12-002 с HLA-DR7 в сравнении с показателями связывания пептидов с известной иммуногенностью с молекулами МНС II класса: POSTN-002 и MMP12-002 выделены серым цветом.

Ранг пептида	Код пептида	Источник	Относительный показатель связывания 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

Сравнение показателей связывания POSTN-002 и MMP12-002 с показателями связывания других пептидов с известной иммуногенностью с молекулами МНС II класса показали, что способность к связыванию обоих пептидов, в основном, находятся в середине и нижней половине таблиц, за исключением HLA-DR2. Способность к связыванию обоих пептидов с HLA-DR2 находятся в верхней половине таблицы для MMP12-002, делая его наиболее предпочтительным кандидатом. Исходя из этого анализа, следует ожидать, что оба пептида, POSTN-002 и MMP12-002, в равной степени индуцируют иммунный ответ.

Список цитируемой литературы

- 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.
- Badiglian 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.
- 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.
- Belaouaj 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.
- 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 Ca²⁺-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. *J Exp. Clin Cancer Res.* *28*, 25.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Byrns MC, Jin Y, Penning TM (2011). Inhibitors of type 5 17beta-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.
- 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.
- 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.
- 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, Lecoeur 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.*
- 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- α promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* *80*, 1489-1496.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Denys H, De WO, Nusgens B, Kong Y, Sciort R, Le AT, Van DK, Jadidzadeh 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.
- 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.
- Dolznic 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.
- Drucker KL, Kitange GJ, Kollmeyer TM, Law ME, Passe S, Rynearson 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Gorrin Rivas MJ, Arai 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, Arai 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.
- 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.
- 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.
- Gruter P, Taberero 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.
- 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, Kiemeny 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Houghton AM, Grisolano 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, Poulson 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Traskelin AL, Perveen R, Kivitie-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.
- 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.*
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, Frankenne 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.
- 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.
- Le CB, Rynkowski M, Le MM, Bruyere C, Lonz C, Gras T, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Ruyschaert 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, Kirschek 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.
- 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.
- 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 angiotropic human melanoma cells in a chick chorioallantoic membrane model. *J Cutan. Pathol.* 36, 1237-1243.
- 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.

- 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 xk1p2 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 Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol. Chem.* 272, 28815-28818.
- 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.
- 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, Alijagic 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 Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nat Genet.* 14, 191-194.
- 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.
- 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.

- Pascolo S, Ginhoux F, Laham N, Walter S, Schoor O, Probst J, Rohrlich 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.
- 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.
- 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.
- 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, Hennet T (2011). Identification of domains and amino acids essential to the collagen galactosyltransferase activity of GLT25D1. *PLoS. ONE.* *6*, e29390.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Puppin 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.

- 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, Bachor 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, Polesskaya 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 Ca²⁺ 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, Hennet 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.
- Scieglinska D, Piglowski 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg 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.
- Sohr S, England 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.
- 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).*
- 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 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3 β -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.
- Stuart JE, Lulis 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.
- 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.
- Sutherlin 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den DP, Brocker 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.
- 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, Dejenefte 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, Rovo 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.

Utispan K, Thuwajit P, Abiko Y, Charnkhaew 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, Merx 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, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* 171, 4974-4978.

Wang C, Rajput S, Watabe K, Liao DF, Cao D (2010a). Acetyl-CoA carboxylase- α 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.
- Watrin 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). Basonuclin 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.
- 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.
- 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.
- Ye H, Yu T, Temam S, Ziober 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.
- 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.
- Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, Senturk S, Celik E, Toyly A, Tasdemir N, Yilmaz M, Erdal E, Akcali KC, Atabey 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *FASEB J* *18*, 754-756.
- 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, Oлару 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 III α . *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, Suciu 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, Hagemeyer A, Speleman F, Lessard M, Otten J, Vilmer E, Dastugue N (2004). Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of 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, Kajiwara 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.
- 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. *Glycobiology* 21, 1554-1569.
- Qian Y, Fritzscht 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 (2009). Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3244-3256.
- Schmid BC, Rezniczek 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.
- 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.
- 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 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.
- 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 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.
- 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.
- 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.
- 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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, имеющий длину вплоть до 16 аминокислот и содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID No. 39, или ее фармацевтически приемлемую соль.
2. Пептид по п.1, где указанный пептид имеет длину от 9 до 14 аминокислот, и более предпочтительно где пептид состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 39.
3. Пептид по любому из п.п. 1 - 2, где указанный пептид модифицирован, удлинён на N-конце и/или C-конце с помощью вплоть до четырех аминокислот и/или включает непептидные связи.
4. Пептид по любому из пп. 1–3, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности, слит с N-терминальными аминокислотами антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR, или слит с антителом.
5. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по любому из пп. 1–4, где указанная нуклеиновая кислота является ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями, или вектор экспрессии способный экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту.
6. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии по п. 5, где указанная клетка-хозяин не является человеческой эмбриональной стволовой клеткой, и необязательно где указанная клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, необязательно дендритной клеткой.
7. Выделенный связующий агент, выбранный из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, белка, нуклеиновой кислоты, пептида, ТКР или растворимого ТКР или его фрагмента, который специфично связывается с пептидом по любому из пп. 1–4, или с комплексом указанного пептида с молекулой МНС.
8. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1–4 или его фармацевтически приемлемую соль, нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии по п. 5, выделенный связующий агент по п. 7, и по меньшей мере один другой компонент, выбранный из

группы, состоящей из фармацевтически приемлемых носителей и/или вспомогательных веществ.

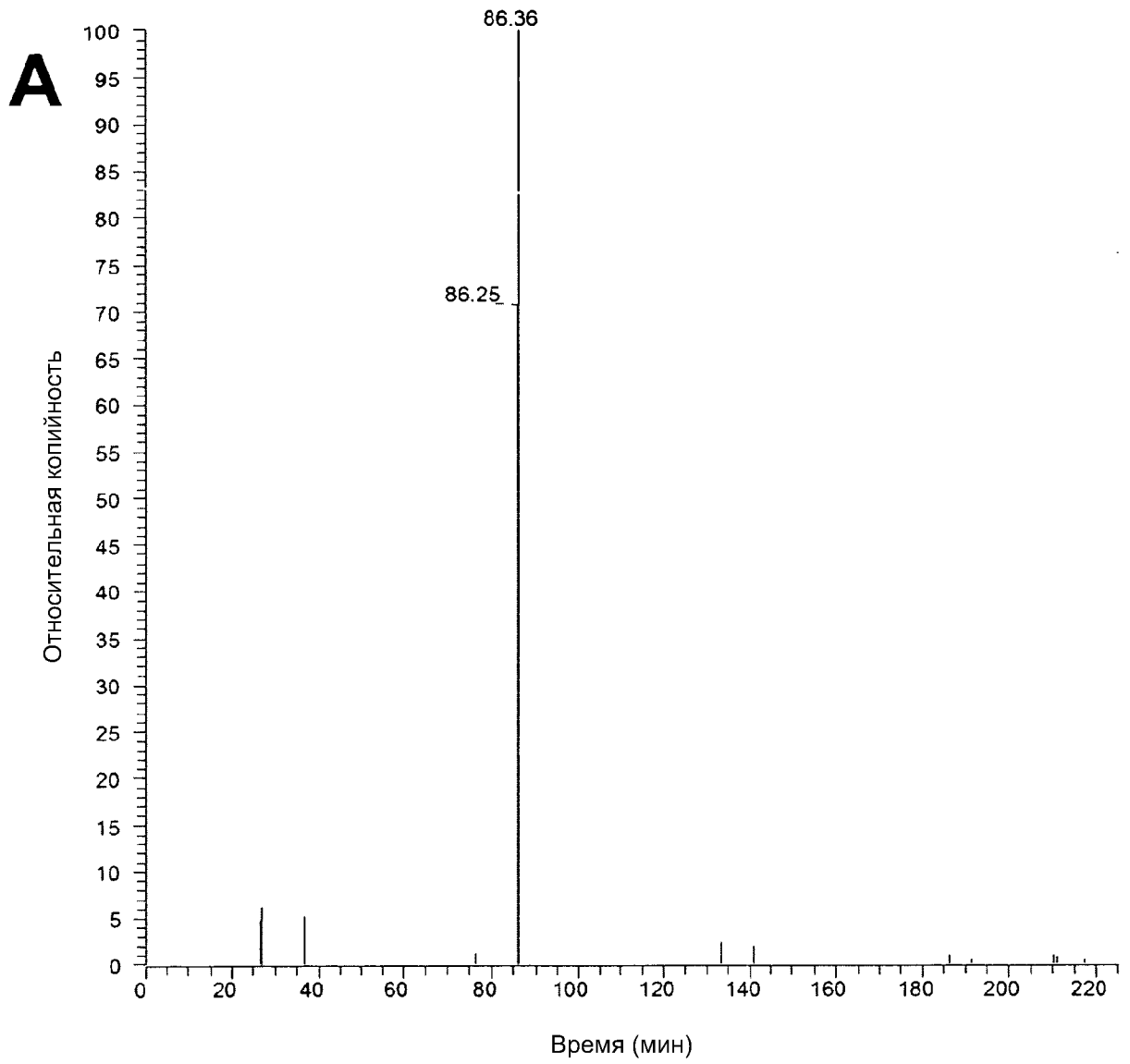
9. Способ получения *in vitro* активированного цитотоксического Т-лимфоцита (ЦТЛ) или хелперной Т-клетки (Th-клетки), где способ включает контактирование ЦТЛ или Th-клетки *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации указанных ЦТЛ антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом по любому из пп. 1–4.

10. Активированный цитотоксический Т-лимфоцит (ЦТЛ) или хелперная Т-клетка (Th-клетка), полученная способом по п. 9, где указанный ЦТЛ или Th-клетка селективно распознают клетку, которая презентрует пептид по любому из пп. 1–4.

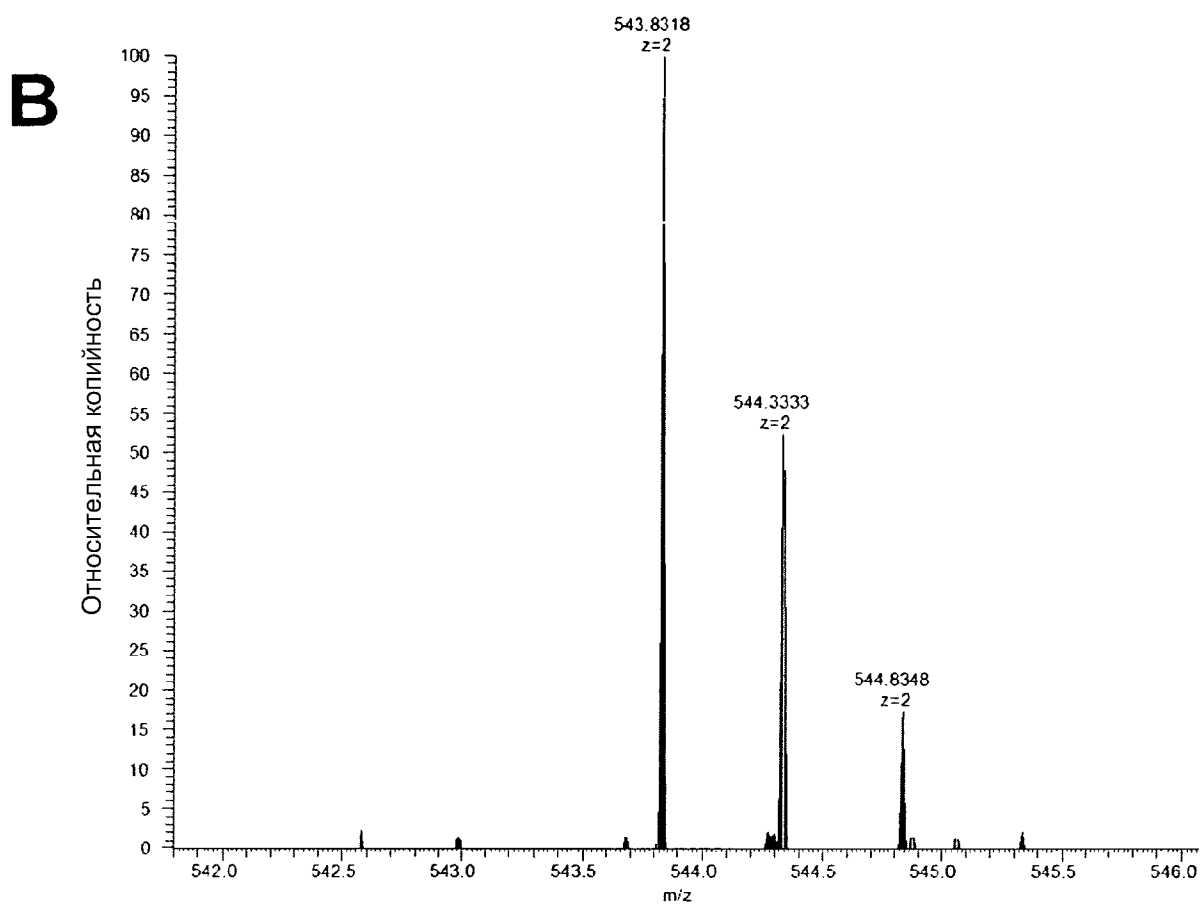
11. Аутологичная или аллогенная цитотоксическая Т-клетка (ЦТЛ) или хелперная Т-клетка (Th-клетка) человека, рекомбинантно трансфицированная Т-клеточным рецептором по п. 7.

12. Применение пептида по любому из пп. 1–4, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии по п. 5, клетки-хозяина по п. 6, выделенного связующего агента по п. 7, или активированного Т-лимфоцита по п. 10 или для диагностики и/или лечения рака, рак легкого, в частности немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака желудка, и/или глиобластомы.

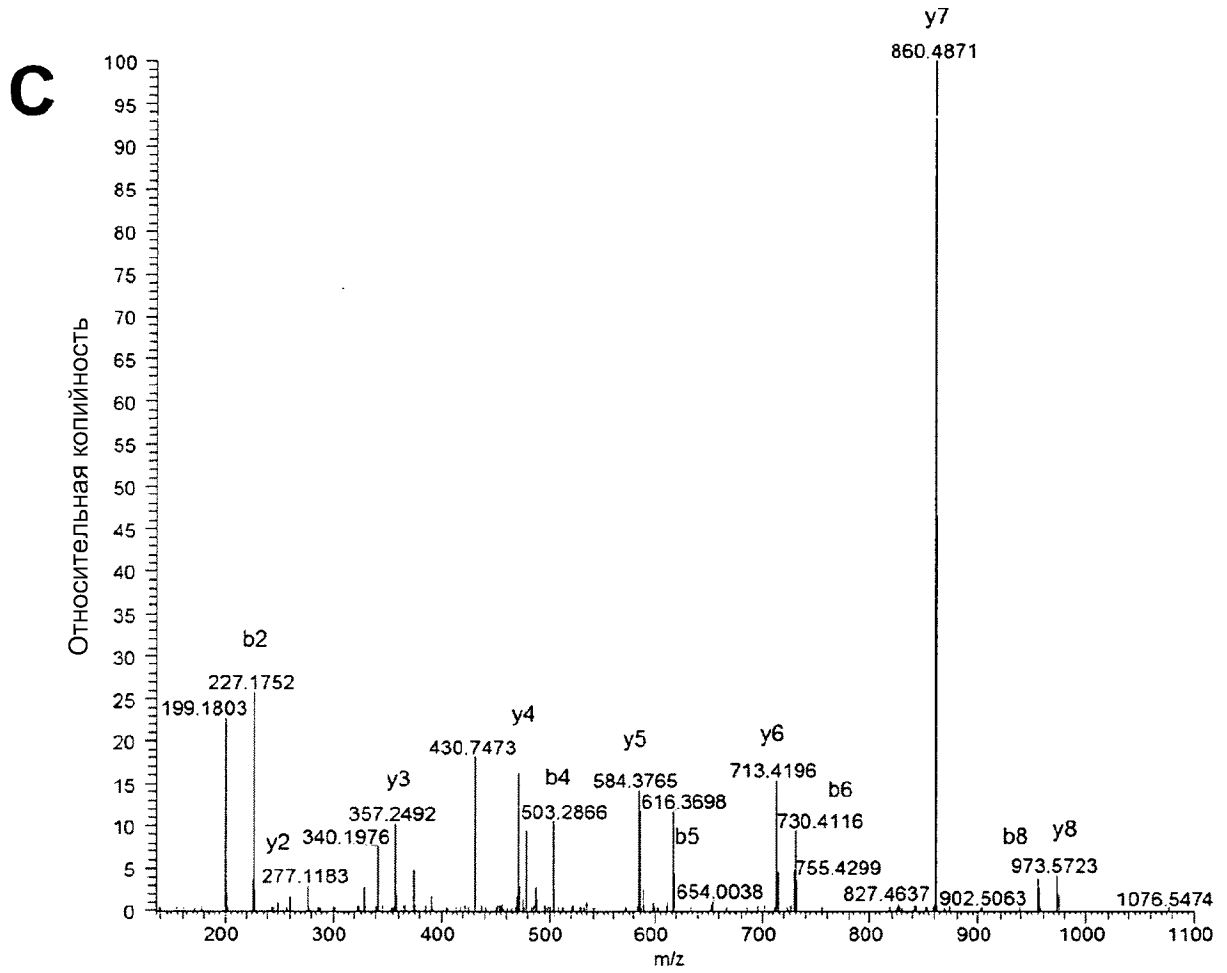
Фигура 1



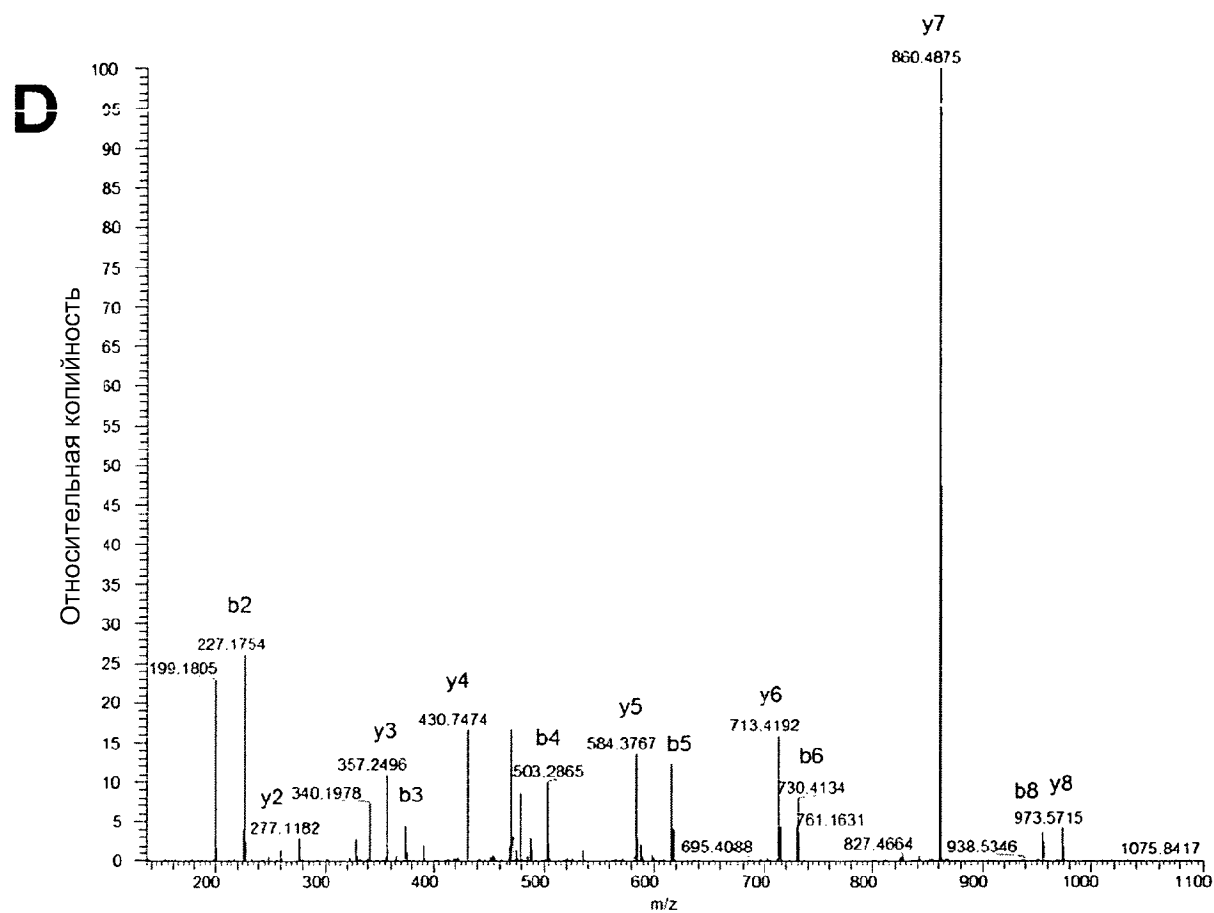
Фигура 1 (продолжение)



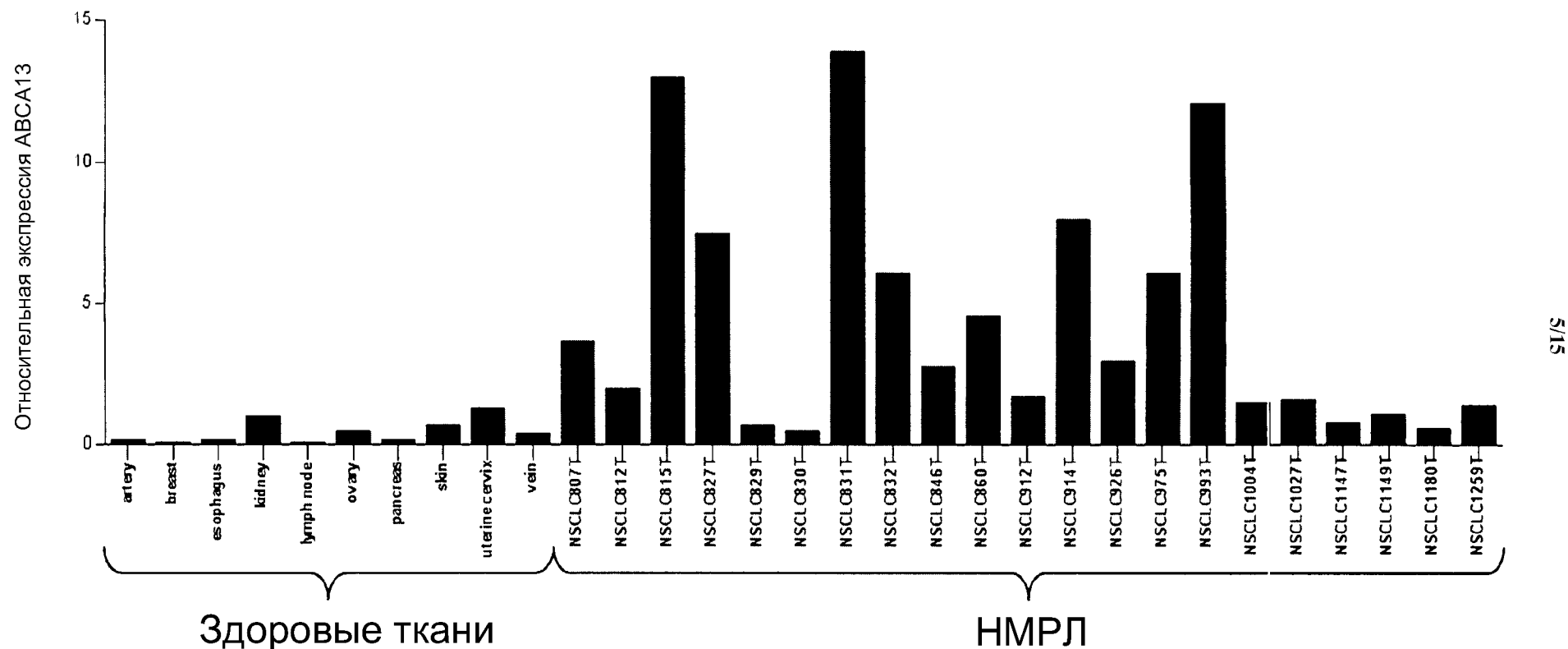
Фигура 1 (продолжение)



Фигура 1 (продолжение)



Фигура 2а



51/5

Artery = артерия

Breast = молочная железа

Esophagus = пищевод

Kidney = почка

Lymph node = лимфатический узел

Ovary = яичник

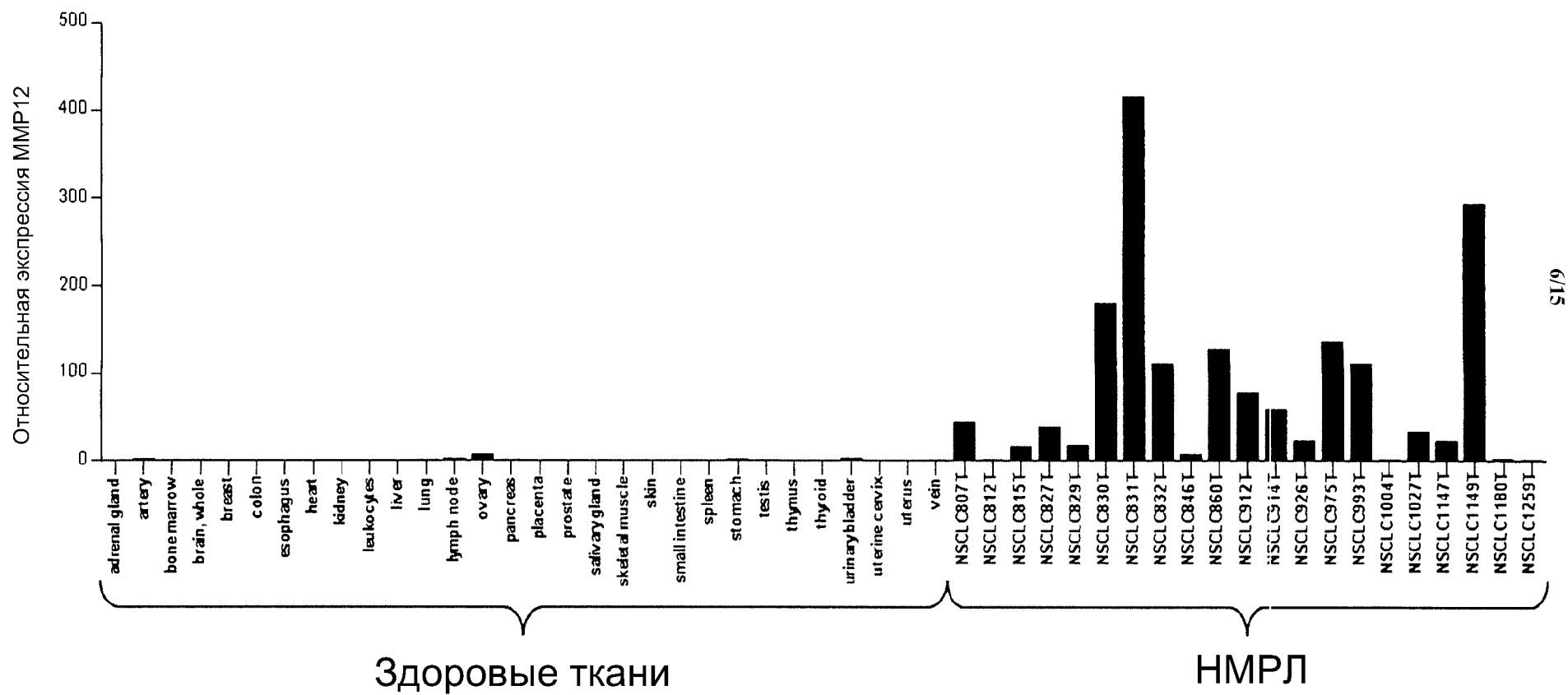
Pancreas = поджелудочная железа

Skin = кожа

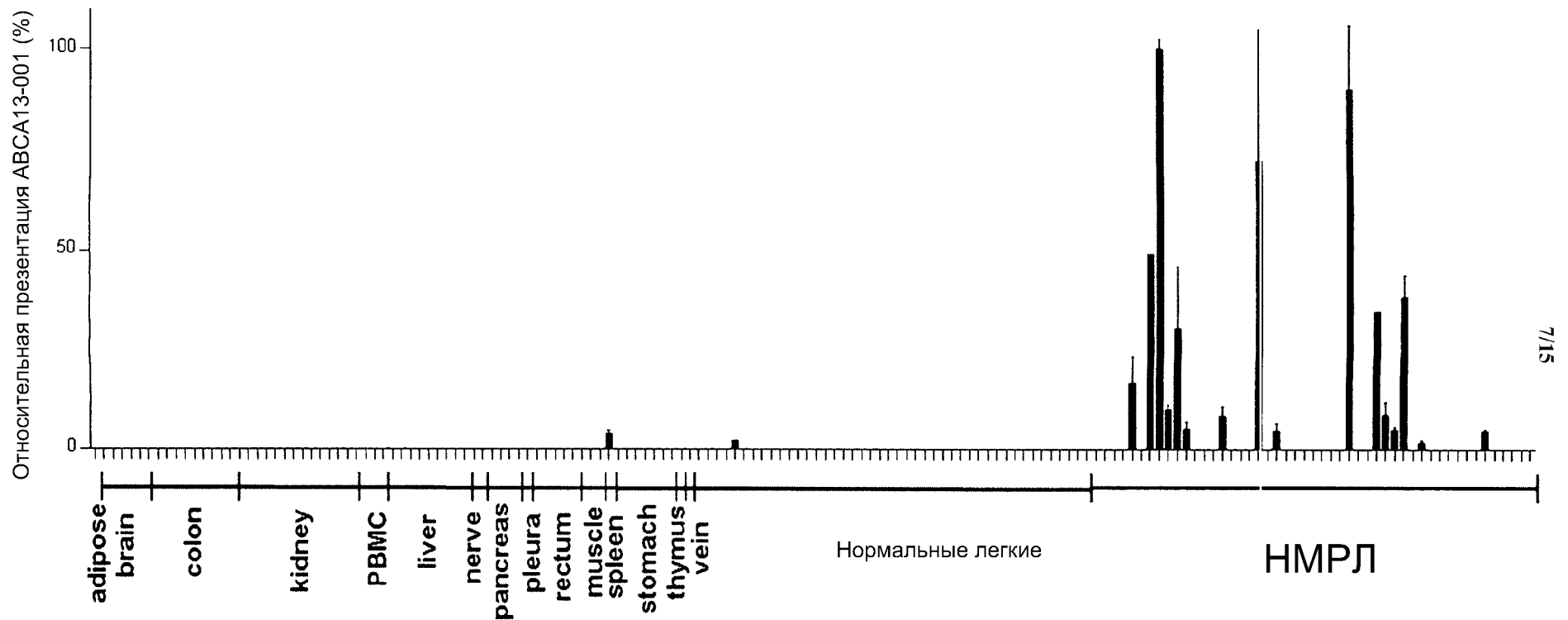
Uterine cervix = шейка матки

Vein = вена

Фигура 2b

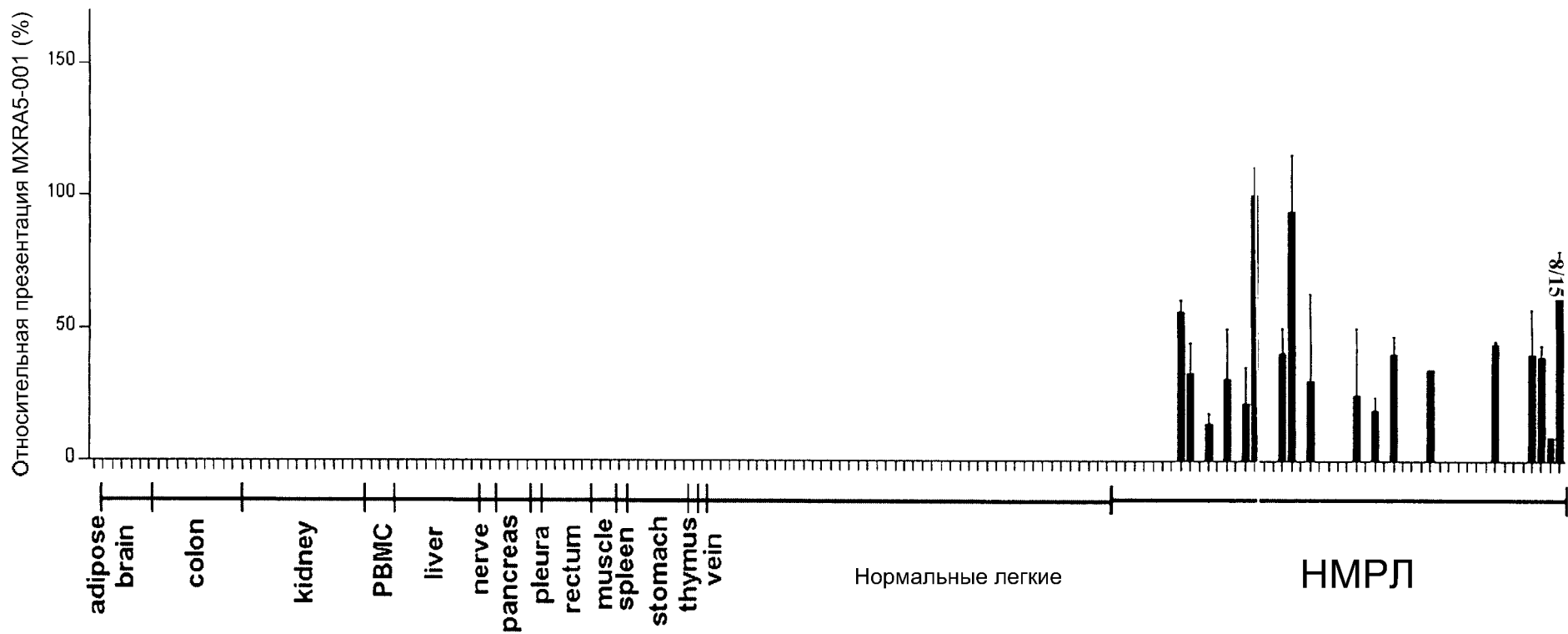


Фигура 3а



- Adipose = жировая ткань
- Brain = головной мозг
- Colon = толстая кишка
- Kidney = почка
- Liver = печень
- PBMC = МПК
- Nerve = нерв
- Pancreas = поджелудочная железа
- Pleura = плевра
- Rectum = прямая кишка
- Muscle = мышца
- Spleen = селезенка
- Stomach = желудок
- Thymus = вилочковая железа
- Vein = вена

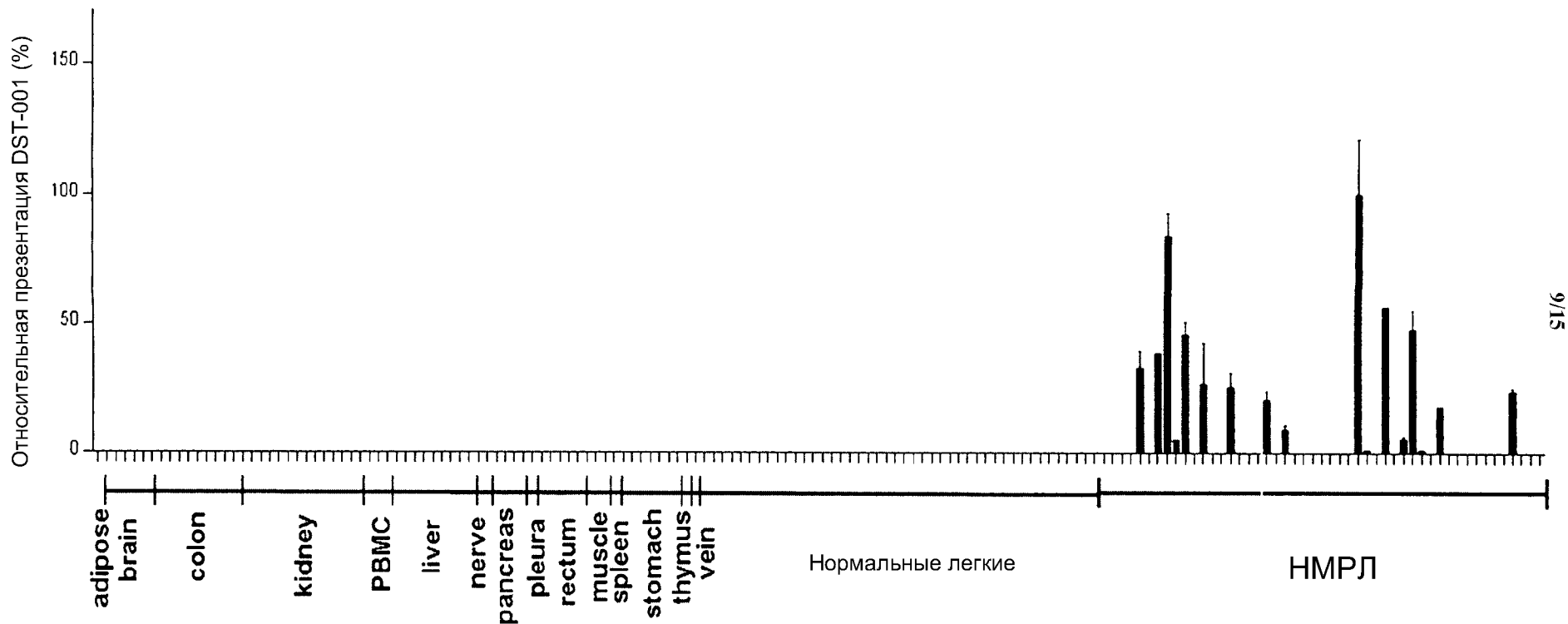
Фигура 3b



Adipose = жировая ткань
 Brain = головной мозг
 Colon = толстая кишка
 Kidney = почка
 Liver = печень
 PBMC = МПК
 Nerve = нерв
 Pancreas = поджелудочная железа

Pleura = плевра
 Rectum = прямая кишка
 Muscle = мышца
 Spleen = селезенка
 Stomach = желудок
 Thymus = вилочковая железа
 Vein = вена

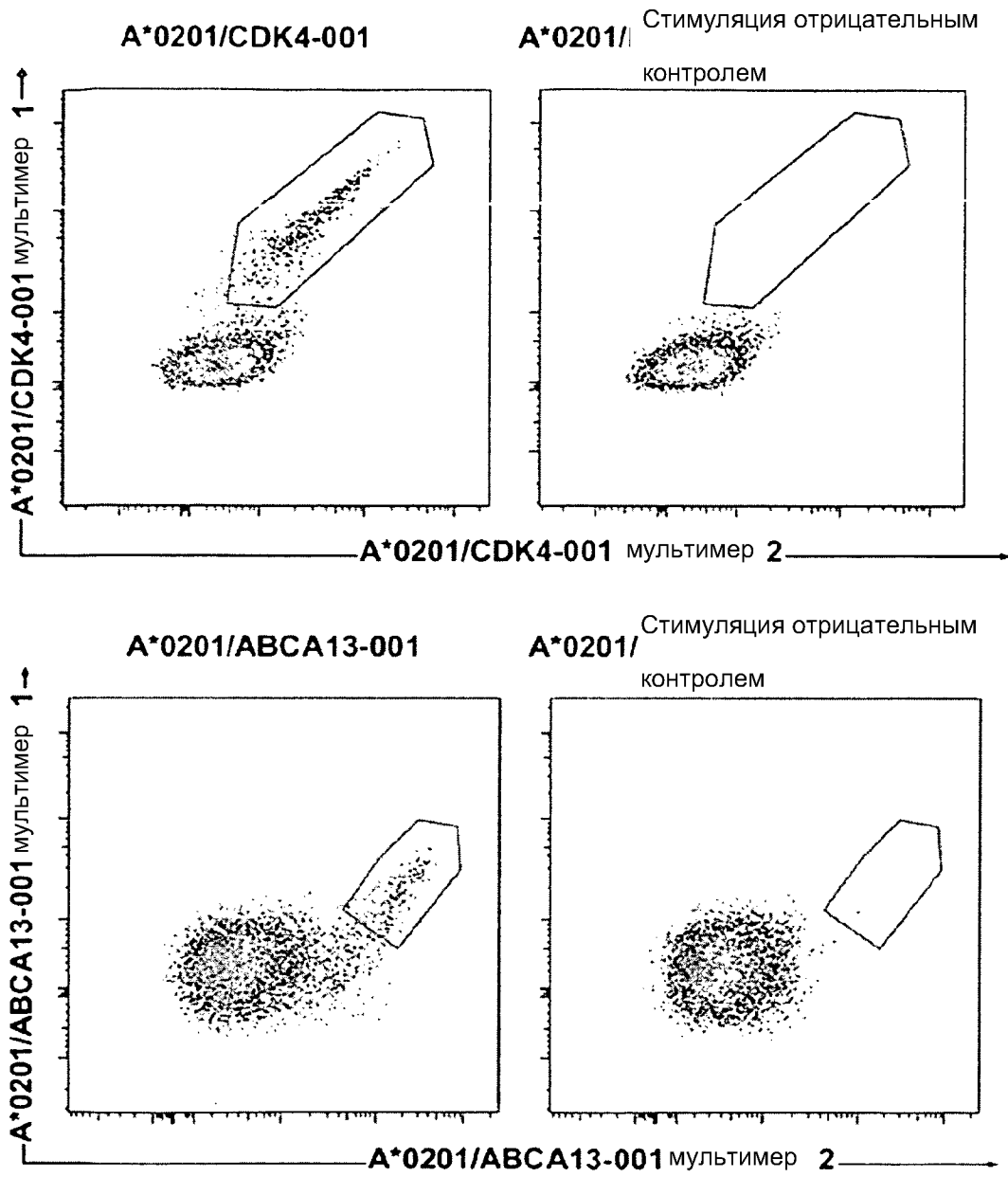
Фигура 3с



Adipose = жировая ткань
 Brain = головной мозг
 Colon = толстая кишка
 Kidney = почка
 Liver = печень
 PBMC = МПК
 Nerve = нерв
 Pancreas = поджелудочная железа

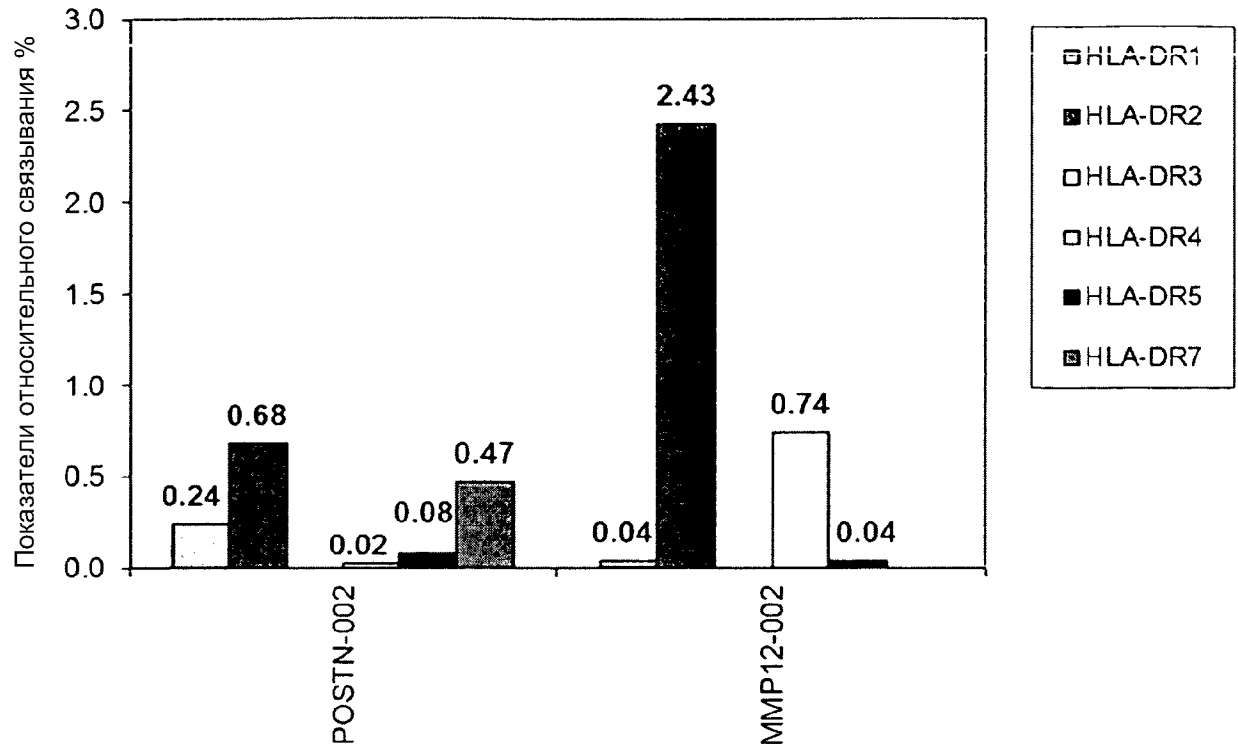
Pleura = плевра
 Rectum = прямая кишка
 Muscle = мышца
 Spleen = селезенка
 Stomach = желудок
 Thymus = вилочковая железа
 Vein = вена

Фигура 4

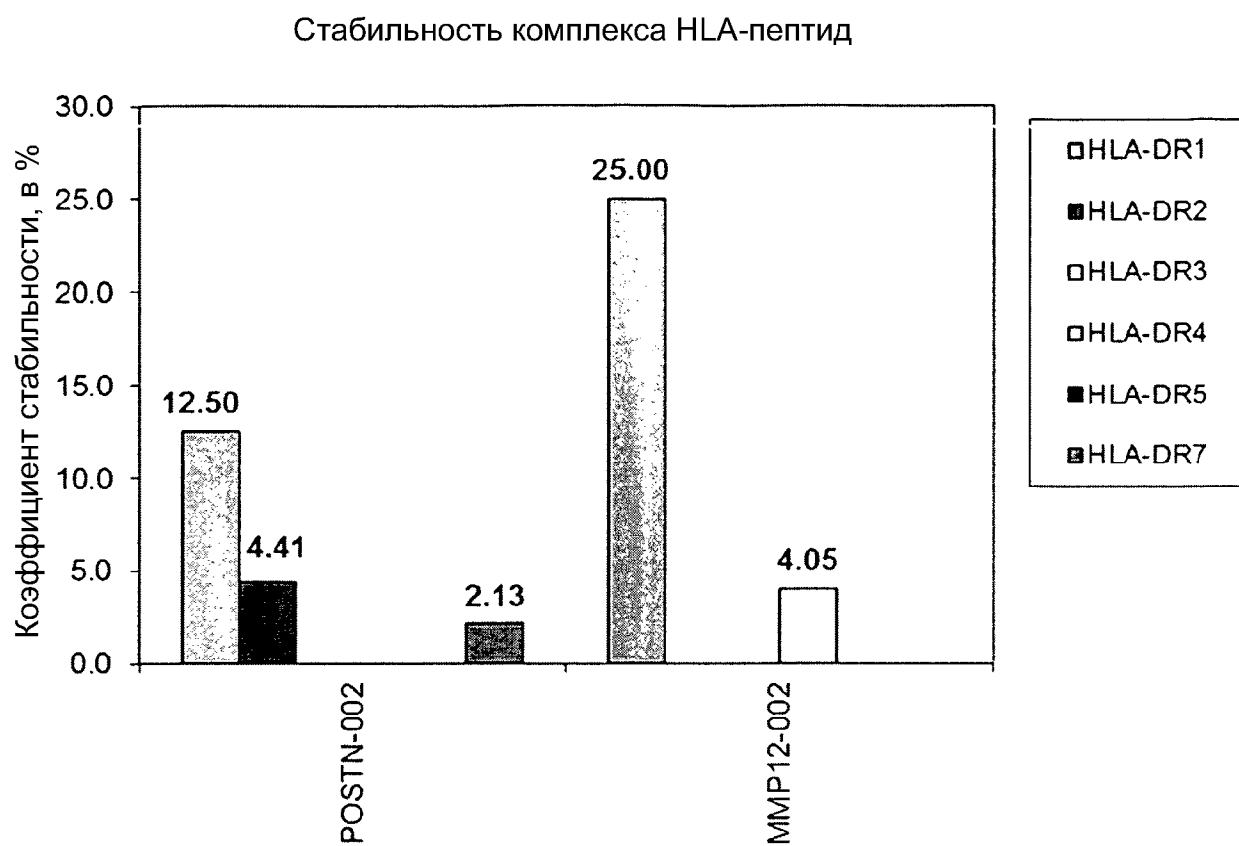


Фигура 5

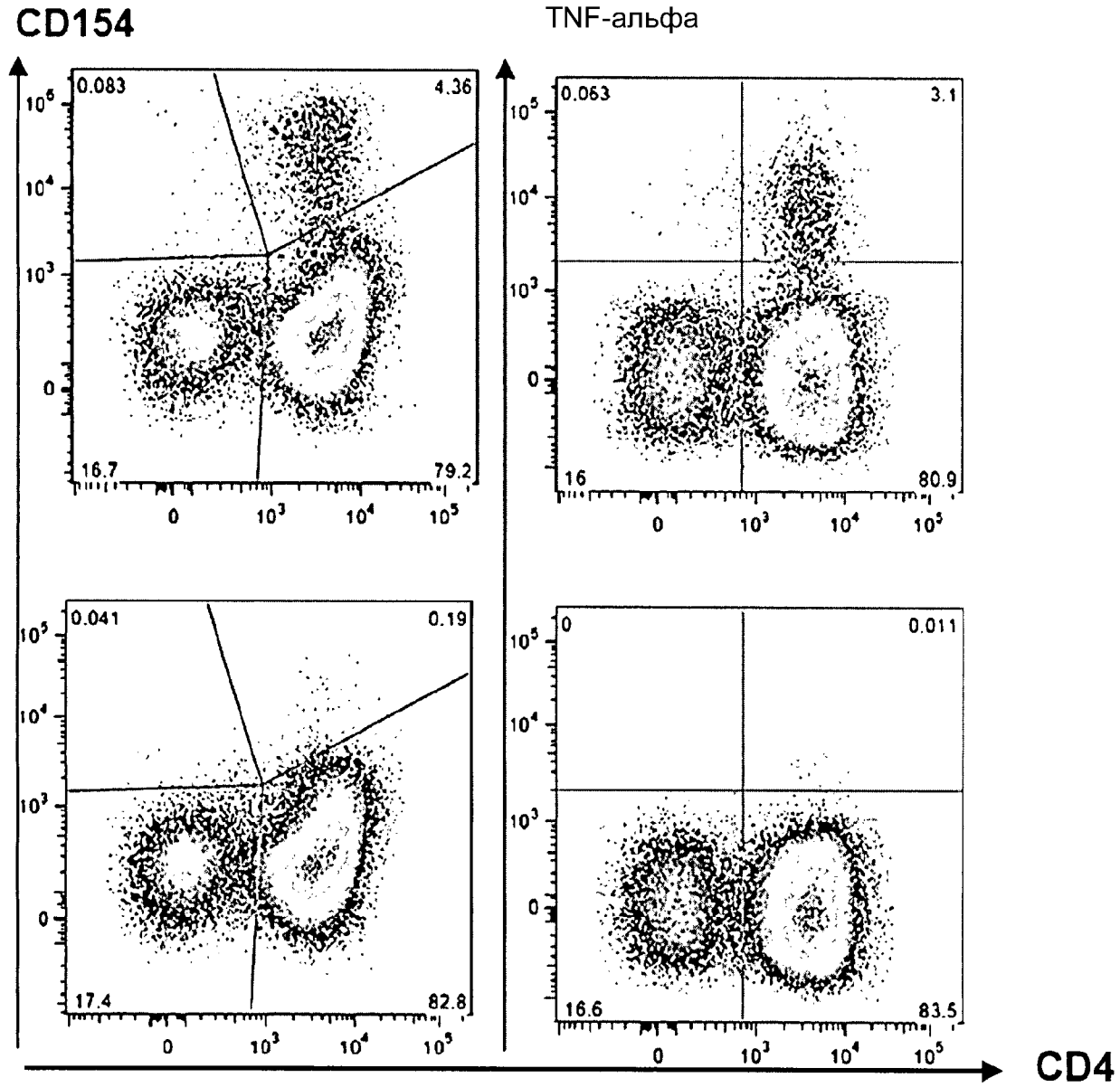
Характеристики связывания



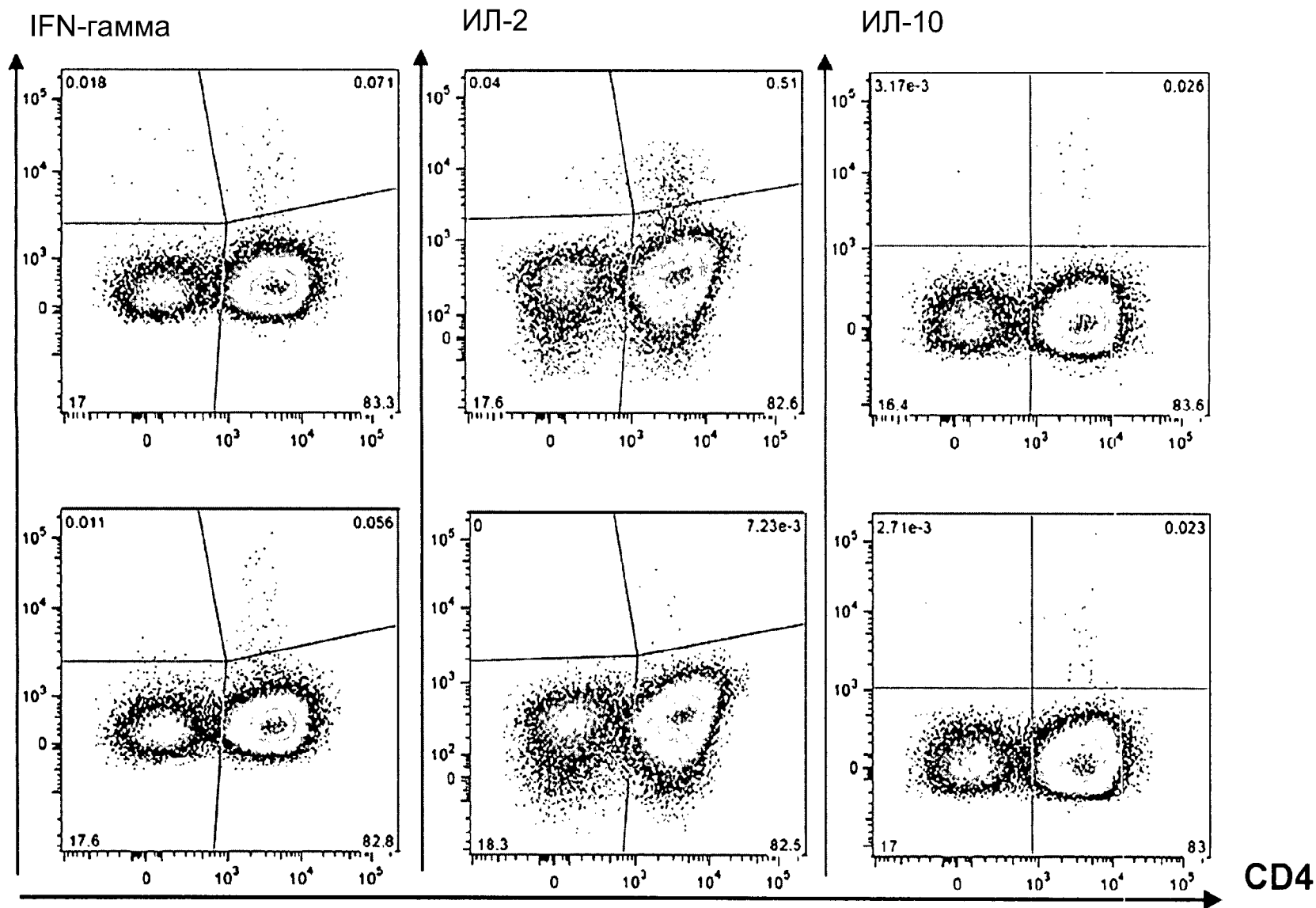
Фигура 6



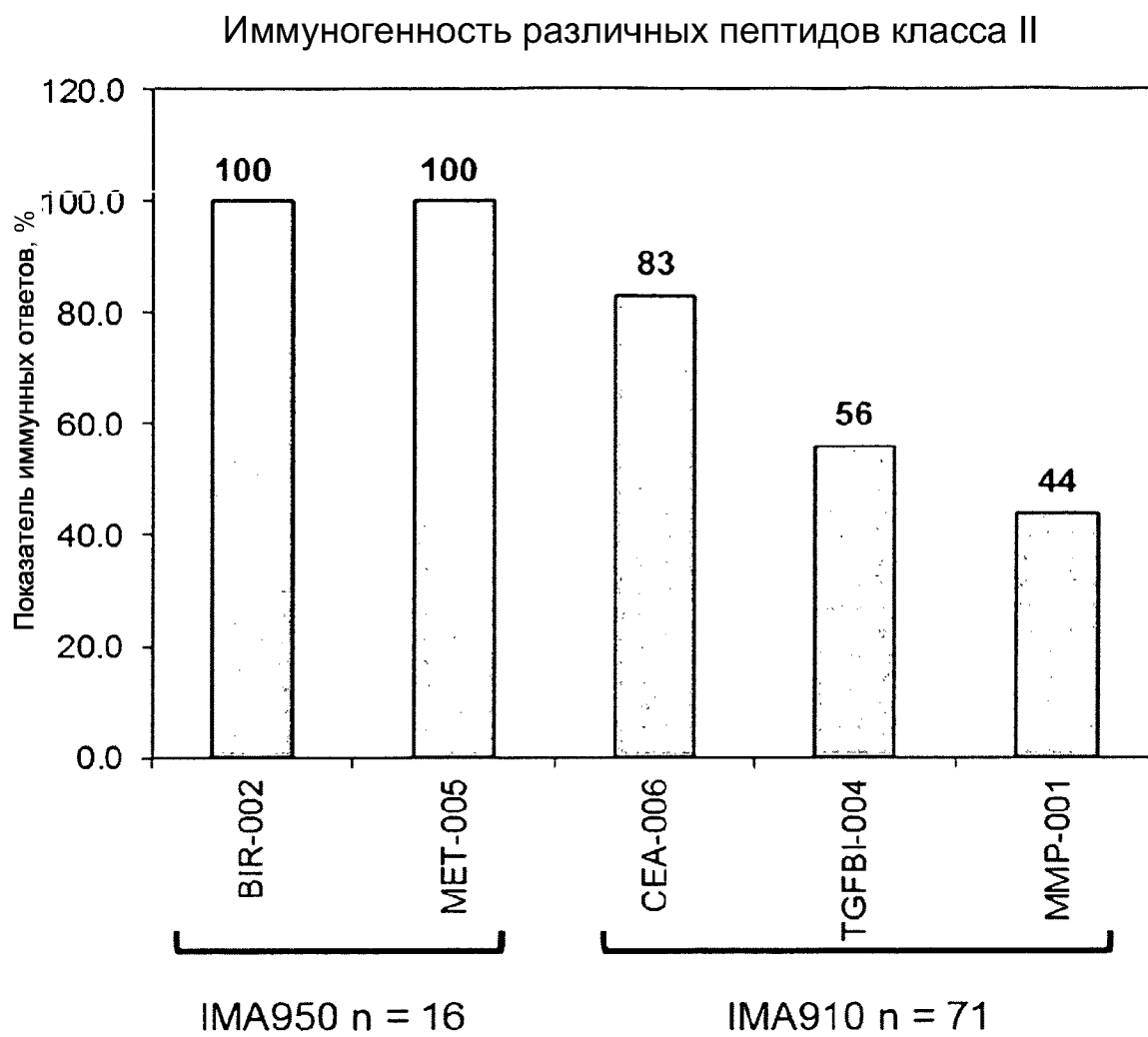
Фигура 7



Фигура 7 (продолжение)



Фигура 8



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202090821

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 38/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 15/11, 15/63, A61K 38/04, 38/00, A61P 35/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2010/037514 A2 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH et al.) 08.04.2010, формула	1-12
A	RU 2435783 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "МЕ-ТАМАКС") 10.12.2011, формула	1-12

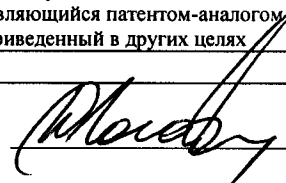
последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **05/10/2020**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

 Д.Ю. Рогожин