



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.18

(21) Номер заявки
201690511

(22) Дата подачи заявки
2011.03.15

(51) Int. Cl. **C07K 7/00** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) НОВЫЕ СПОСОБЫ ИММУНОТЕРАПИИ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ОПУХОЛЕЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ РАКА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И РАКА ЖЕЛУДКА

(31) 61/315,704; 1004551.6

(32) 2010.03.19

(33) US; GB

(43) 2016.11.30

(62) 201201306; 2011.03.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Вайншенк Тони, Фриче Йенс, Вальтер
Штеффен, Левандровский Петер,
Сингх Харприт (DE)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Дементьев
В.Н., Глухарёва А.О., Карпенко
О.Ю., Клюкин В.А., Строкова О.В.,
Христофоров А.А. (RU)**

(56) US-A1-20090136528
SURI A. et al.: Identification of naturally processed peptides bound to the class I MHC molecule H-2-K^d of normal and TAP-deficient cells, European Journal of Immunology, 2005, табл. 1, SEQ AAN 46088. Найдено из Интернет: <URL: http://www.wiley-vch.de/contents/jc_2040/2006/26235_s.pdf

MARKIEWICZ M. A. et al.: IL-12 enhances CTL Synapse Formation and Induces Self- reactivity. J Immunol, 2009, Vol. 82, n. 3 pp. 1351-1361, с. 2, последний абз. Найдено из Интернет: <URL: <http://www.jimmunol.org/content/182/3/1351.long>

STEVANOVIC S. et al.: Generating data for databases-the peptide repertoire of HLA molecules, Immunoinformatics: Bioinformatic Strategies for Better Understanding of Immune Function., Wiley, Chichester Novartis Foundation Symposium, 2003, vol. 254, pp. 143-164, с. 146, табл. 1

EP-A2-1568373

US-A1-20090004213

BERGWELT-BAILDON VON M. S. et al.: T-Cell Responses to Cyclin B1 Are Not Restricted to p53-Overexpressing Tumors, Clin Cancer Res, 2009, vol. 15, no. 22, p. 7106

GREINER J. et al.: Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8⁺T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia, Blood, 2005, vol. 106, pp.938-945, с. 941, табл. 2

WEINZIERL A.O. et al.: Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by quantitative mass spectrometry, European Journal of Immunology, 2008, табл. 2, Gene symbol TPX2, Найдено из Интернета URL: http://www.wiley-vch.de/contents/jc_2040/2008/38136_s.pdf

(57) 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 как активные фармацевтические ингредиенты композиций вакцины, стимулирующей противоопухолевые иммунные ответы. Изобретение относится к 95 новым пептидным последовательностям и их вариантам, полученным из молекул HLA I класса человеческих опухолевых клеток, которые могут быть применены в вакцинных композициях с целью вызывания противоопухолевых иммунных ответов.

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 эпитомам Т-клеток CD8⁺, в отдельности или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, которые служат как активные фармацевтические ингредиенты композиций вакцины, стимулирующей противоопухолевые иммунные ответы. Настоящее изобретение относится к 33 новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA класса I человеческих опухолевых клеток, которые могут быть использованы в вакцинных композициях в целях вызывания противоопухолевых иммунных ответов, в частности ответов цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ).

Уровень техники

Рак желудка является заболеванием, при котором злокачественные клетки формируются в слизистой оболочке желудка. Рак желудка может развиваться в любой части желудка и может распространяться по всему желудку и проникать в другие органы; в частности, пищевод, легкие и печень. Рак желудка занимает четвертое место по частоте распространения в мире, в 2002 г. этот диагноз был поставлен в 930 000 случаев. Это заболевание связано с высокой смертностью (~800 000 случаев в год), из-за чего оно является второй по частоте причиной летального исхода от рака после рака легких. Оно более распространено среди мужчин и возникает чаще в странах Азии и развивающихся странах. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>).

На него приходится ежегодно 2% (25500 случаев) всех новых случаев заболевания раком в США, однако данное заболевание больше распространено в других странах. Это самый распространенный вид рака в Корее, на который приходится 20,8% всех злокачественных новообразований. В Японии рак желудка остается наиболее распространенным видом рака у мужчин. В США диагноз рак желудка ежегодно ставится около 13000 мужчин и 8000 женщин, большинству из которых больше 70 лет.

Рак желудка занимает четвертое место по частоте распространения в мире после рака легких, молочной железы, рака толстой и прямой кишки. Кроме того, рак желудка продолжает быть второй по частоте причиной летального исхода от рака. По прогнозу Американского общества по борьбе с раком число новых случаев заболевания в 2007 г. предположительно составило один миллион, около 70% из которых приходится на развивающиеся страны и с ними связано около 800000 летальных исходов (http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Facts_and_Figures_2007_rev2.pdf).

В отношении частоты заболеваемости по всему миру существуют колоссальные географические различия. Наиболее высокий процент распространения заболевания приходится на Азию и части Южной Америки, наиболее низкий - на Северную Америку. Наиболее высокий уровень смертности зарегистрирован в Чили, Японии, Южной Америке и в странах бывшего Советского Союза.

Зачастую диагноз рака желудка ставится на поздней стадии, так как скрининговое обследование не проводится в большинстве стран мира, за исключением Японии (и в ограниченной степени в Корее), где обнаружение зачастую происходит на ранней стадии. Таким образом, это продолжает оставаться наиболее сложной задачей для специалистов здравоохранения. Фактором риска для заболевания раком желудка является бактериальная инфекция *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), курение, потребление соли в больших количествах и другие факторы, связанные с питанием. Небольшое число случаев рака желудка (1-3%) связаны с синдромом наследственной предрасположенности к раку желудка. Мутации гена *E-кадгерина* происходят приблизительно у 25% семей с аутосомным доминантным геном предрасположенности к раку желудка диффузного вида. Этот подвид рака желудка получил название наследственный диффузный рак желудка. Целесообразным может быть проведение генетического консультирования и принятие во внимание профилактической гастрэктомии в юном возрасте при бессимптомном протекании усечения зародышевой линии.

Стенки желудка состоят из трех слоев тканей: слизистого (глубинного) слоя, мышечного (среднего) слоя и серозного (крайнего) слоя. Рак желудка развивается в клетках, выстилающих слизистую оболочку, и распространяется во время роста во внешние слои. Применяются четыре стандартных способа лечения. Лечение рака желудка может включать хирургическую операцию, химиотерапию, лучевую терапию или химиолучевую терапию. Операция является основным способом лечения рака желудка. Целью операции является проведение полной резекции с отрицательным хирургическим краем (резекция типа R0). Однако приблизительно 50% пациентов, больных местно-распространенным раком желудка, не могут быть подвергнуты резекции типа R0. Тип R1 указывает на микроскопические признаки неполной резекции (положительные края); и R2 указывает на макроскопические признаки неполной резекции, но без отдаленного распространения заболевания. Исход для пациента зависит от стадии рака во время постановки диагноза (Руководство по клинической практике в онкологии Национальной онкологической сети США (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™)).

Процент выживаемости в течение 5 лет в случае радикальной резекции составляет 30-50% для пациентов на II стадии заболевания и 10-25% для пациентов на III стадии заболевания. Для этих пациентов существует высокая вероятность появления локальных и системных рецидивов. Метастазы появляются у 80-90% лиц, больных раком желудка, а показатель шестимесячной выживаемости равен 65% для тех,

кому диагноз был поставлен на ранних стадиях, и менее 15% для тех, кому диагноз был поставлен на поздних стадиях.

Таким образом, до сих пор существует потребность в новом, эффективном и безопасном способе лечения рака желудка, карциномы предстательной железы, карцином полости рта, плоскоклеточной карциномы полости рта (OSCC), острой миелоидной лейкемии (AML), вызываемом *H. pylori* MALT-лимфомы, карциномы толстого кишечника/колоректального рака, глиобластомы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), карциномы шейки матки, рака молочной железы человека, рака предстательной железы, рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, рака яичника, почечно-клеточной карциномы, рака печени, опухолей головного мозга различных фенотипов; лейкемии, такой как острая лимфобластная лейкемия (ALL); рака легких, саркомы Юинга, эндометриального рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, эпителиального рака гортани, карциномы пищевода, карциномы ротовой полости, карциномы мочевого пузыря, карцином яичника, почечно-клеточной карциномы, атипичической менингиомы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухолей головного мозга, карциномы слюнного протока, рака шейки матки, экстракраниальных T/NK-клеточных лимфом, нехожжиной лимфомы и злокачественных солидных опухолей легких и молочной железы, а также других видов опухолей, в целях улучшения самочувствия пациентов без применения химиотерапевтических средств или же других препаратов, которые могут вызывать серьезные побочные эффекты.

В настоящее изобретение включены пептиды, которые стимулируют иммунную систему и выполняют функцию противоопухолевых препаратов неинвазивного способа воздействия.

Краткое изложение сущности изобретения

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 объединения обеих ветвей 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 природной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки (TCD8+), 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-микроглобулина (рецепторы МНС класса I) или альфа-и бета-цепи (рецепторы МНС класса II), соответственно. Их трехмерная конформация образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами. МНС класса I презентуют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, продуктов DRIP и более крупных пептидов. Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК). В первую очередь, они презентуют 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 Т-клеточный рецептор (ТКР), 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 часто встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

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 ЦТЛ, то есть их эпитопы, 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.

Актуальная классификация опухолеассоциированных антигенов (ТАА) включает следующие ос-

новые 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 сперматоцитах/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 без ограничения, тирозиназу и Melan-A/MART-1 для меланомы или PSA для рака предстательной железы.

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

г) 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, как правило, способны вызвать сильные иммунные ответы, не вызывая риска аутоиммунных реакций по отношению к нормальным тканям. С другой стороны, данные ТАА в большинстве случаев имеют отношение только к 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 гиперэкспрессированными 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, приводящего к появлению новых эпитопов в опухолях, как в случае MUC1, или при таких как белковый сплайсинг во время деградации, который может или может не быть опухолеспецифическим.

ж) 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, E6 и E7, которые экспрессированы в клетках карциномы 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 экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями. Далее 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, непосредственно являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, опосредованно опухолеассоциированными. Такие опосредованно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunoether. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). 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.

По существу, 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 дифференциальных транскрипционных профилей или дифференциальных паттернов пептидной экспрессии между опухолевыми и нормальными тканями.

Однако идентификация генов, гиперэкспрессированных 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 субпопуляция 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 важно выбрать лишь те пептиды из гиперэкспрессированных или селективно экспрессированных белков, которые презентуются в соединении с молекулами МНС, против которых может быть обнаружена функциональная 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").

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 комплексы из пептидов и МНС-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.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1:

А) Пример масс-спектра CDC2-001, демонстрирующий его презентацию на образце первичной опухоли GC2464. Анализ с помощью ЖХ-МС с системой ионизации в наноэлектроспрее (NanoESI-LCMS) производили на пептидном пуле, элюированном из образца ткани РЖ 2464. Масс-хроматограмма для m/z $597,3501 \pm 0,001$ Да, $z = 2$ показывает пик пептида со временем удержания 151,63 мин;

В) Выявленный пик в масс-хроматограмме при 151,63 мин обнаружен сигналом для m/z 597,3501 на масс-спектре;

С) Индуцированный столкновением масс-спектр затухания из выбранного предшественника m/z 597,3501, записанный при эксперименте nanoESI-LCMS при заданном времени удержания, подтвердил присутствие CDC2-001 в опухолевом образце GC2464;

Д) Шаблон фрагментации синтетического контрольного пептида CDC2-001 записывали и сравнивали с шаблонами фрагментации генерированных природных пептидов TUMAP, представленных в фиг. С для верификации последовательности.

Фиг. 2: Профили экспрессии мРНК выбранных белков в нормальных тканях и 25 образцах тканей рака желудка

а) CDC2 (Идентификатор набора проб: 203213_at)

б) ASPM (Идентификатор набора проб: 219918_s_at)

Фиг. 3: Отдельные результаты пептид-специфической иммуногенности *in vitro* пептидов TUMAP I класса. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, нагруженных релевантным (левая секция) и нерелевантным пептидом (правая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания релевантными и нерелевантными А*2402-мультимерами. Среди показанных клеток проводили гейтирование живых лимфоцитов CD8+, и цифрами на точках обозначена процентная доля мультимер-положительных клеток.

Подробное описание изобретения

Все термины, используемые в контексте данного изобретения, 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. Предпочтительно, чтобы пептиды имели длину в 9 аминокислот, но они могут быть короче, длиной в 8 аминокислот, и длиннее - 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислот в длину.

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, как правило, состоят из менее чем примерно 30 аминокислотных остатков в длину и более чем примерно 14 аминокислот в длину.

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 эпи-

топы. В отличие от понятий "пептид" или "олигопептид", понятие "полипептид" введено для обозначения молекул, содержащих более чем 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 контексте настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать Т-клеточный ответ. Таким образом, "иммуноген" будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ.

Для Т-клеточного "эпитопа" 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, как правило, имеют длину в 8-14 аминокислот и, в особенности, как правило, 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-A*024 являются примерами различных аллелей МНС I класса, которые могут экспрессироваться из этих локусов.

Таблица 1: Частоты экспрессии F HLA*A024 и наиболее частые серотипы HLA*A02402. Частоты экспрессии выведены из частот гаплотипа G_f среди населения США, адаптированных из публикации (Mog_i и соавт. 1017-27) с использованием формулы Харди-Вейнберга $F=1-(1-G_f)^2$. Более подробная информация представлена в работе (Chanock и соавт. 1211-23).

Частоты экспрессии HLA*24 и серотипов A*2402 по всему миру

Аллель	Популяция	Фенотип, рассчитанный из частоты
ь		аллеля
A*24	Филиппины	65%
A*24	Русские	61%
	ненцы	
A*240	Япония	59%
2		
A*24	Малайзия	58%
A*240	Филиппины	54%
2		
A*24	Индия	47%
A*24	Южная	40%
	Корея	
A*24	Шри-Ланка	37%
A*24	Китай	32%
A*240	Индия	29%
2		
A*24	Западная	22%
	Австралия	
A*24	США	22%
A*24	Россия,	20%
	Самара	
A*24	Южная	20%
	Америка	
A*24	Европа	18%

Используемая в контексте данного описания ссылка на последовательность ДНК включает как одонитевую, так и двунитевую ДНК. Таким образом, специфическая последовательность, если в контексте не указано иное, относится к одонитевой 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 изме-

ненного 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.

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 сегменты предлагаются в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслированными последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслированной ДНК могут присутствовать по нисходящей от 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 синтез дезоксирибонуклеотидной цепи.

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 мас.% 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 мас.%, предпочтительно по меньшей мере около 0,1 мас.%. Рассматриваются также обогащенные препараты с концентрацией примерно 0,5, 1, 5, 10 и 20 мас.%. 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 адьювантом животному, такому как млекопитающее, например кролику или мышью, также включая человека; таковой

иммунный ответ, принимающий форму стимуляции ответа Т-клетки, 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. Это означает, что любой такой фрагмент будет обязательно содержать как часть его аминокислотной последовательности сегмент, фрагмент или участок, который по существу идентичен, если не в точности идентичен последовательности SEQ ID NO: 1 по 33, которая соответствует встречающимся в природе или "материнским" белкам последовательностей с SEQ ID NO: 1 по 33. При использовании по отношению к полинуклеотидам эти понятия относятся к продуктам, полученным при обработке указанных полинуклеотидов любой из известных 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:

$$\text{Процентная доля идентичности} = 100 [I-(C/R)]$$

где "С" является числом различий между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью по длине выравнивания между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью, где

- (i) каждое основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего выровненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, и
- (ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и
- (iii) каждое выровненное основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые отличаются от выровненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, представляют собой различие; и

"R" - это число оснований или аминокислот в Контрольной последовательности по длине выравнивания со Сравниваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в Контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

Если существует выравнивание между Сравниваемой последовательностью и Контрольной последовательностью, для которых процентная доля идентичности, по расчетам выше, приблизительного равна или выше установленной минимальной Процентной доли идентичности, тогда Сравниваемая 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 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. Такие замены могут носить консервативный характер, например, где одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, так же как при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативным будет замена аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, такое как 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 кислотной аминокислоты другой, которая имеет полярность, или даже такой, которая имеет соновной 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 бла-

гоприятным 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 с практически эквивалентной или большей антигенной активностью, чем та, что определена 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 на 4 позициях внутри пептида одновременно.

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, чтобы ЦТЛ, специфичные для пептида с SEQ ID NO: 1 по 33, были испытаны относительно замещенных пептидов; концентрация пептида, при которой замещенные 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, еще 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.

Иммунотерапевтические подходы в лечении

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. Различные механизмы объединения обеих ветвей иммунной системы, как гуморальной, так и клеточной, исследуются в настоящее время для иммунотерапии рака.

Отдельные элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) из популяций опухолеинфильтрирующих клеток или из периферической крови позволяет предположить, что такие клетки играют важную роль в природной 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 также являются человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Молекулы МНС I класса могут встречаться на большинстве клеток, имеющих ядро, которые презентуют 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".

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 быть экспрессирован преимущественно опухолевыми клетками, а не здоровыми тканями или в сравнительно малом объеме. Далее 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 в апоптозе. В дополнение также нисходящие мишени белков, непосредственно являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть

мишенями вакцинационного подхода. В обоих случаях необходимо присутствие эпитопов 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 основном, 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 у пациентов или здоровых субъектов, или же они основаны на генерировании различных профилей транскрипции или различном характере экспрессии пептидов опухолевыми и нормальными тканями (Lemmel и соавт. 450-54; Weinschenk и соавт. 5818-27).

Однако идентификация генов, гиперэкспрессированных 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 субпопуляция 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 важно выбрать лишь те пептиды из гиперэкспрессированных или селективно экспрессированных белков, которые презентуются в соединении с молекулами МНС, против которых может быть обнаружена функциональная Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции конкретным антигеном может быть клонирована и способна выполнять эффекторные функции ("эффекторная Т-клетка").

Т-хелперные клетки играют важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы Т-хелперных клеток, инициирующие ответы Т-хелперных клеток типа ТН1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих комплексы опухолеассоциированный пептид/МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, эпитопы опухолеассоциированных пептидов 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.

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 задачей настоящего изобретения является предложение 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 желудка, в частности. Кроме того, существует необходимость в идентификации факторов, которые могут быть использованы при лечении рака вообще и рака желудка в частности.

Более того, не существует стандартного способа лечения пациентов, больных раком желудка с биохимическим рецидивом после радикальной простатэктомии, обычно вызываемым резидуальным остатком опухоли *in situ* при наличии локально прогрессирующего роста опухоли. Желательны были бы новые терапевтические подходы, которые бы сопровождалась низкой смертностью с адекватной терапевтической эффективностью по сравнению с имеющимися на данный момент терапевтическими подходами.

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения рака желудка и других видов опухолей, которые гиперэкспрессируют пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ образцов первичного рака желудка человека, эти пептиды презентировались в естественных условиях молекулами HLA (см. Пример 1 и фиг. 1).

Исходный ген, из которого образованы пептиды, был представлен в гиперэкспрессированном состоянии при раке желудка, почечно-клеточной карциноме, раке толстой кишки, мелкоклеточной карциноме легких, аденокарциноме, раке предстательной железы, доброкачественных новообразованиях и злокачественной меланоме по сравнению с нормальными тканями (см. Пример 2, и фиг. 2), демонстрирующие высокую степень взаимосвязи пептида с опухолью, т.е. эти пептиды эти пептиды в большом количестве презентуются на опухолевой ткани, но не на нормальных тканях.

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

Все пептиды настоящего изобретения, которые были совместимы с методикой валидации, см. При-

мер 3, как было показано, в состоянии стимулировать Т-клеточные ответы (см. Пример 3 и фиг. 3). Таким образом, эти пептиды 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 со сравнимыми количествами 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 настоящего изобретения понятие "фармацевтически приемлемая соль" относится к производным раскрытых в изобретении пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислотных или основных солей агента. Например, кислотные соли получают из свободного основания (как правило, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу $-NH_2$) с применением 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, оксиянтарную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, р-толуолсульфокислоту, салициловую кислоту и подобные, так и неорганические кислоты, например, хлористоводородную 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) 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 желудка, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют 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 знать патоморфологу, что ткань является злокачественной или воспаленной или же пораженной заболеванием вообще. Присутствие групп пептидов может позволить классифицировать или выделить подклассы пораженных тканей.

Выявление пептидов на образцах пораженной заболеванием ткани может позволить принять решение о целесообразности 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 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. Такие иммунные ответы лимфоцитов могут использоваться в качестве прогностических маркеров для принятия решения о дальнейших этапах терапии. Данные иммунные 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, адаптивным 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 последующих обследований после трансплантации, к примеру, для выявления реакций "хозяин против трансплантата" и "трансплантат против хозяина".

Пептиды могут использоваться для генерации и разработки 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 PET (позитронно-эмиссионная томография). Это может помочь в обнаружении небольших метастазов или в определении размера и точной локализации пораженных тканей.

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

В табл. 2 описаны пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO; и исходные белки, из которых могут быть образованы данные пептиды. Все пептиды связываются с аллелями HLA A*024.

Таблица 2. Пептиды настоящего изобретения

SEQ NO:	ID	Последовательность	Исходный белок (белки)
1	CDC2-001	LYQILQGIVF	CDK1
2	ASPM-002	SYNPLWLRI	ASPM
3	UCHL5-001	NYLPFIMEL	UCHL5
4	MET-006	SYIDVLPEF	MET
5	PROM1-001	SYIIDPLNL	PROM1
6	MMP11-001	VWSDVTPLT F	MMP11
7	MST1R-001	NYLLYVSNF	MST1R
8	NFYB-001	VYTTSYQQI	NFYB
9	SMC4-001	HYKPTPLYF	SMC4
10	UQCRB-001	YYNAAGFNK L	UQCRB
11	PPAP2C-001	AYLVYTDRL	PPAP2C
12	AVL9-001	FYISPVNKL	AVL9
13	NUF2-001	VYGIRLEHF	NUF2
14	ABL1-001	TYGNLLDYL	ABL1
15	MUC6-001	NYEETFPHI	MUC6
16	ASPM-001	RYLWATVTI	ASPM
17	EPHA2-005	VYFSKSEQL	EPHA2
18	MMP3-001	VFIFKGNQF	MMP3
19	NUF2-002	RFLSGIINF	NUF2
20	PLK4-001	QYASRFVQL	PLK4
21	ATAD2-002	KYLTVKDYL	ATAD2
22	COL12A1-001	VYNPTPNL	COL12A1
23	COL6A3-001	SYLQAANAL	COL6A3
24	FANCI-001	FYQPKIQQF	FANCI
25	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
26	ATAD2-001	AYAIKEEL	ATAD2
27	ATAD2-003	LYPEVFEKF	ATAD2
28	HSP90B1-001	KYNDTFWK EF	HSP90B1
29	SIAH2-001	VFDTAIAHLF	SIAH2
30	SLC6A6-001	VYPNWAIGL	SLC6A6
31	IQGAP3-001	VYKVVGNLL	IQGAP3
32	ERBB3-001	VYIEKNDKL	ERBB3
33	KIF2C-001	IYNGKLFDLL	KIF2C

Другие интересующие пептиды HLA A*024 по изобретению

SEQ ID NO:	Код пептида	Последовательность	Исходный белок (белки)
34	CCDC88A-001	QYIDKLNEL	CCDC88A
35	CCNB1-003	MYMTVSIIDRF	CCNB1
36	CCND2-001	RYLPQCSYF	CCND2
37	CCNE2-001	IYAPKLQEF	CCNE2
38	CEA-010	IYPDASLLI	CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6
39	CLCN3-001	VYLLNSTTL	CLCN3
40	DNAJC10-001	IYLEVIHNL	DNAJC10
41	DNAJC10-002	AYPTVKFYF	
42	EIF2S3-001	IFSKIVSLF	EIF2S3, LOC255308
43	EIF3L-001	YYYVGFAYL	EIF3L, LOC340947
44	EPPK1-001	RYLEGTSCI	EPPK1
45	ERBB2-001	TYLPTNASLSF	ERBB2
46	GPR39-001	SYATLLHVL	GPR39
47	ITGB4-001	DYTIGFGKF	ITGB4
48	LCN2-001	SYNVTSVLF	LCN2
49	SDHC-001	SYLELVKSL	LOC642502, SDHC
50	PBK-001	SYQKVIELF	PBK
51	POLD3-001	LYLENIDEF	POLD3
52	PSMD14-001	VYISSLALL	PSMD14
53	PTK2-001	RYLPKGFLNQF	PTK2
54	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
55	TSPAN1-002	VYTTMAEHF	TSPAN1
56	ZNF598-001	DYAYLREHF	ZNF598
57	ADAM10-001	LYIQTDHLFF	ADAM10
58	MMP12-001	TYKYVDINTF	MMP12
59	RRM2-001	YFISHVLAF	RRM2
60	TMPRSS4-001	VYTKVSAYL	TMPRSS4
61	TSPAN8-001	VYKETCISF	TSPAN8

В другом варианте осуществления этого изобретения раскрыты пептиды против рака желудка, связывающиеся с HLA A*02. Для индивидов, являющихся A*02-и/или A*24-положительными, смеси раскрытых в изобретении пептидов могут применяться для лечения рака желудка. Предпочтительными являются смеси из 2 до 20 пептидов и смеси из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20 пептидов.

SEQ ID NO:	Код пептида	Последовательность	Исходный белок (белки)
62	DIO2-001	ALYDSVILL	DIO2
63	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3
64	LMNB1-001	LADETLKLV	LMNB1
65	WNT5A-001	AMSSKFFLV	WNT5A
66	FAP-003	YVYQNNIYL	FAP
67	COPG-001	VLEDLEVTV	COPG, COPG2, TSGA13
68	COL6A3-002	FLLDGSANV	COL6A3
69	COL6A3-003	NLLDLDYEL	COL6A3
70	COL6A3-004	FLIDSSEGV	COL6A3
71	PSMC2-001	ALDEGDIAL	PSMC2
72	UBE2S-001	ALNEEAGRLLL	UBE2S
73	KIF11-001	ILSPTVVISI	KIF11
74	ADAM8-001	KLLTEVHAA	ADAM8
75	CCNB1-001	ALVQDLAKA	CCNB1
76	CDC6-001	ILQDRLNQV	CDC6
77	F2R-001	TLDPRSFLL	F2R
78	OLFM4-001	TLDDLLLYI	OLFM4
79	THY1-001	SLLAQNTSWLL	THY1
80	CEP250-001	SLAEVNTQL	CEP250
81	HIF1A-001	ALDGFVMVL	HIF1A
82	KRAS-001	GVDDAFYTL	KRAS
83	MET-001	YVDPVITSI	MET
84	NCAPG-001	YLLSYIQSI	NCAPG
85	NCAPG-002	QIDDVTIKI	NCAPG
86	TOP-004	YLYGQTTTYL	TOP2A
87	TOP-005	KLDETGNLSL	TOP2A
88	LAMC2-002	RLDDLKMTV	LAMC2
89	AHR-001	LTDEILTYV	AHR
90	CCNB1-002	ILIDWLQVQV	CCNB1
91	CEACAM6-001	VLYGPDVPTI	CEACAM6
92	COPB1-001	SIFGEDALANV	COPB1
93	HMMR-001	KLLEYIEEI	HMMR
94	TPX2-001	KILEDVVGCV	TPX2
95	TOP-001	KIFDEILVNA	TOP2A, TOP2B

Белок цикла клеточного деления 2 (CDC2)

Сериновая/треониновая киназа CDC2, также известная как Cdk1 (циклинзависимая киназа 1), играет ключевую роль в контроле клеточного цикла. Он известен как основной регулятор перехода от G2 к фазе M. В конце интерфазы он связывается с циклинами А-типа. После разрушения ядерной оболочки циклины А-типа заменяются циклином В, который образует фактор стимуляции митоза (MPF) с Cdc2. MPF необходим для прохождения клетками фазы митоза.

Функция белка Cdc2 в митозе не является избыточной и не может быть компенсирована активностью других Cdk, таких как Cdk2, 4 и 6. Напротив, об Cdc2 сообщалось, что он задействован в других фазах клеточного цикла, таких как переход G1-S, и он способен заменить Cdk периода интерфазы. Таким образом, как было предложено, Cdc2 является единственным Cdk, незаменимым для клеточного цикла.

Гиперэкспрессия Cdc2 была обнаружена при нескольких видах рака и часто соотносилась с плохим прогнозом. Среди них находятся карцинома предстательной железы, карциномы ротовой полости, плос-

клеточные карциномы ротовой полости (OSCC), острая миелоидная лейкемия (AML) (Qian и соавт., 2009), *H. pylori*-индуцированная MALT-лимфома (Banerjee и соавт., 217-25) и карцинома толстой кишки (Yasui и соавт., 36-41). При раке желудка сообщалось о гиперэкспрессии и/или повышенной активности, и это может его причиной. Ингибиторы Cdc2 и другие белки Cdks рассматривали в качестве кандидатов для лекарственных средств для лечение рака (Shapiro, 1770-83).

Белок, ассоциированный с аномальной веретеновидной микроцефалией (ASPM)

Аномальный ген белка веретена деления (ASPM), ассоциированный с микроцефалией, является человеческим ортологом гена ахроматического веретена дрозофилы (*asp*). Он принимает участие в регуляции развития нервных клеток, и его мутации приводят к первичной аутосомной рецессивной микроцефалии. Во время митоза ASPM локализован на полюсах веретена деления. Гиперэкспрессия ASPM была предложена в качестве маркера и потенциальной терапевтической мишени при глиобластоме. Опосредованный siРНК нокдаун ингибирует пролиферацию опухолевых клеток и нейрональных стволовых клеток. Гиперэкспрессия ASPM может также предсказывать усиленный инвазивный/метастатический потенциал, быстрый рецидив опухоли и плохой прогноз при почечно-клеточной карциноме. ASPM экспрессируется в повышенном количестве в иммортализованных клетках и в тканях немелкоклеточного рака легких (Jung, Choi, и Kim 703-13).

Матричные металлопротеазы 3 (MMP11)

MMP3, называемый также прохелатиназой или стромелизином 1, является эндопептиназой, которая расщепляет компоненты внеклеточного матрикса (ECM), такие как фибронектин, ламинин, эластин, центральный белок протеогликанов и неспиральные цепи коллагенов. MMP важны во время нескольких физиологических процессов, требующих перегруппировку ECM, таких как миграция клеток во время эмбриогенеза, ремоделирование тканей, васкуляризация, инволюция молочной железы и заживление ран. MMP3 также играет роль в накоплении тромбоцитов. Патологические состояния с увеличением экспрессии и секреции MMP3 включают аутоиммунные воспалительные процессы и рак.

MMP3 экспрессируется в избытке клетками некоторых видов опухолей и играет важную роль при эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП). Он также может вносить свой вклад на ранних стадиях онкогенеза, иницируя эпигенетические изменения, которые приводят к появлению злокачественного фенотипа (Lochter и соавт. 180-93). Полиморфизмы промоторной области MMP3, которые связаны с уровнями экспрессии, как было показано, оказывают влияние на степень риска и прогноз при некоторых видах рака, таких как аденокарцинома пищевода (Bradbury и соавт. 793-98) и плоскоклеточная карцинома полости рта (Vairaktaris и соавт. 4095-100) (Liu и соавт. 430-35). *H. pylori*-положительным пациентам, больным раком желудка, с повышенным уровнем сыворотки MMP3- и MMP7 наблюдалась более высокая инвазия лимфатических узлов и более короткая выживаемость. В когорте из 74 пациентов, больных раком желудка, MMP3 экспрессировался в 27% случаев (Murray и соавт. 791-97).

c-Met

c-Met является посредником потенциально онкогенной активности фактора роста гепатоцитов, фактора HGF/scatter, в том числе содействия клеточному росту, подвижности, выживаемости, деградации внеклеточного матрикса и ангиогенеза. Связывание HGF активирует нисходящие сигнальные пути, включая Ras, фосфатидилинозитол 3'-киназу, фосфолипазу C γ , и активированные митогеном каскады реакций, связанные с протеинкиназой (Dong и соавт. 5911-18; Furge и соавт. 10722-27; Furge, Zhang, and Vande Woude 5582-89; Montesano et al. 355-65; Naldini и соавт. 501-04; Ponzetto и соавт. 4600-08). c-Met экспрессируется преимущественно в эпителиальных клетках. Онкогенная активация c-Met (также и в неэпителиальных злокачественных тканях) может быть результатом амплификации/гиперэкспрессии, активирующих мутаций, приобретения HGF/c-Met аутокринных петель или конститутивного фосфорилирования (Di Renzo и соавт. 147-54; Ferracini и соавт. 739-49; Fischer и соавт. 733-39; Koochekroug и соавт. 5391-98; Li и соавт. 8125-35; Maulik и соавт. 41-59; Qian и соавт. 589-96; Ramirez и соавт. 635-44; Tuck и соавт. 225-32) (Nakaigawa и соавт. 3699-705). Конститутивная активация c-Met в организме трансгенных мышей с избыточной HGF-экспрессией способствует онкогенезу широкого спектра (Такаута и соавт. 701-06; Wang и соавт. 1023-34). "Выключение" гена MET приводит к ингибированию роста опухоли и метастазирования (Corso и соавт. 684-93). Амплификация MET была связана с прогрессией рака желудка у человека (Lin и соавт. 5680-89). (Yokozaki, Yasui, и Tahara 49-95).

Убиквитин карбоксилтерминальная гидролаза L5 (UCHL5) UCHL5, известная также как убиквитин C-терминальная гидролаза (UCH37) или INO80R, является ассоциированной с протеасомой деубиквитиной. Она разбивает на части связанные с белком полиубиквитиновые цепи на дистальном конце путем расщепления изопептидной связи между C-концевыми Cys76 и Lys48 (Nishio и соавт., 855-60). В ядре UCHL5 соединена с хроматин-ремоделирующим комплексом Ino80. После связывания с протеасомой она активируется и может управлять процессом транскрипции или репарации ДНК, что, как предполагается, опосредовано Ino80 и протеасомой.

Убиквитин-специфические протеазы, подобные UCHL5, задействованы в нескольких процессах, таких как контроль прохождения клеточного цикла, дифференциация, репликация и репарация ДНК, транскрипция, контроль качества белков, иммунный ответ и апоптоз. Возможно, UCHL5 может способствовать злокачественной трансформации. Ее активность, как было продемонстрировано, повышена в

тканях карциномы шейки матки человека по сравнению с соседней нормальной тканью. Она способна деубиквитинировать и, тем самым, стабилизировать рецептор TGF-бета и его медиаторы нисходящих путей, транскрипционные факторы Smad, тем самым активируя сигнальные каскады, активируемые TGF-бета. Активация сигнальных каскадов с участием TGF-бета может выступать в качестве промотора опухолевого роста на поздних стадиях рака, хотя он обладает двойкой функцией и может также выступать в качестве супрессора роста опухоли на ранних стадиях и до инициации (Bierie и Moses 29-40; Horton и соавт. 138-43; Wicks и соавт. 8080-84; Wicks и соавт. 761-63).

Макрофаг-стимулирующий белковый рецептор (MST1R)

Рецептор MST1R (также известный под названием RON) является членом семейства Met присутствующих на поверхности клеток рецепторов тирозинкиназ, и он, в первую очередь, экспрессируется на эпителиальных клетках и макрофагах. Рецептор MST1R может вызывать клеточную миграцию, инвазию, пролиферацию и выживание клетки в ответ на его лиганд. Онкогенные свойства были продемонстрированы *in vitro*, в равной степени как *in vivo* в моделях с животными, и он часто deregулирован при раковых заболеваниях человека (Dussault и Bellon, 2009). Клинические исследования показали, что гиперэкспрессия MST1R связана с плохим прогнозом и метастазами. Экспрессия MST1R значительна в тканях карциномы желудка и соответствующей паранеопластической ткани, однако она не наблюдается в нормальной слизистой оболочке желудка (Zhou и соавт., 236-40). Нокдаун рецептора MST1R в раковых клетках приводит к снижению хемотаксиса эндотелиальных клеток *in vitro* и к снижению роста опухоли и уменьшению плотности микрососудов после ортотопической трансплантации в предстательную железу *in vivo*. Опосредованный РНК нокдаун MST1R в клеточной линии высоко онкогенного рака толстой кишки приводил к снижению пролиферации в сравнении с контрольными клетками.

Кинезинподобный белок (KIF2C)

KIF2C является деполимеразой микротрубочек, регулирующей их правильное соединение с кинетохорами во время образования веретена деления. Он важен для хромосомной сегрегации во время анафазы и может потребоваться для координации начала разделения сестринских центромеров. Неправильное присоединение микротрубочек к кинетохорам приводит к неправильному расхождению хромосом и анеуплоидии, которая наблюдается в большинстве солидных опухолей (Maneu и соавт. 67-131; Moore и Wordeman 537-46). KIF2C экспрессируется в избытке в раковых клетках молочной железы (Shimo и соавт. 62-70), толстой кишки, в клетках колоректального рака и рака желудка (Nakamura и соавт. 543-49). Клеточная линия рака желудка (AZ521), которая стабильно экспрессировала KIF2C, проявляла повышенную пролиферацию и миграцию по сравнению с клетками с имитированной трансфекцией. Повышенная экспрессия KIF2C в клетках рака желудка может быть ассоциирована с инвазией лимфатических сосудов, метастазами лимфатических узлов и плохим прогнозом. Лечение рака молочной железы короткими интерферирующими РНК против KIF2C ингибировало рост раковых клеток.

Белки 4 поддержания структуры хромосом (SMC4)

Белки, поддерживающие структуру хромосом SMC, являются хромосомными АТФ-азами, которые играют роль в организации структур высшего порядка в хромосомах и их динамики. Белок SMC4 является центральным компонентом комплекса конденсина, который играет роль при конденсации хроматина, а также связан с ядрышковой сегрегацией, репарацией ДНК и сохранением хроматинового скелета. Было обнаружено, что ген SMC4 экспрессируется на высоком уровне в тканях нормальной предстательной железы и слюнной железы, очень слабо - в тканях толстой кишки, поджелудочной железы и кишечника и вообще не экспрессируются в других тканях. Экспрессия РНК на высоком уровне наблюдалась во многих клеточных линиях рака и видах рака, включая рак молочной железы, предстательной железы, толстой кишки и поджелудочной железы (Egland и соавт. 5929-34).

Рецептор 2 эфрина типа-А (EphA2)

Рецепторы Eph являются уникальным семейством рецепторных тирозинкиназ (RTK), которые играют ведущую роль в формировании органов и систем эмбриона, нейронном нацеливании и развитии сосудистой системы во время нормального эмбриогенеза. Стимуляция EphA2 его лигандом (ephA2) приводит к автофосфорилированию EphA2, стимуляция обращает вспять онкогенную трансформацию. Рецепторы Eph и их лиганды, эфрины, часто экспрессируются в избытке во множестве видов рака. EphA2 часто экспрессируется в избытке и имеет функциональные изменения в клетках агрессивных опухолей, и как считается, способствует росту опухоли посредством повышения клеточной адгезии внеклеточного матрикса, безъякорного роста и ангиогенеза. Избыточная экспрессия EphA2 и EphrinA-1 была продемонстрирована в клетках карциномы желудка, и она была взаимосвязана с глубиной инвазии опухоли, стадиями опухоли по классификации TNM, метастазами в лимфатических узлах и плохим прогнозом (Yuan и соавт. 2410-17).

ATAD2

Белок ATAD2 (также известен как ANCCA) - это новый член семейства АТФаз AAA+. Он усиливает транскрипционную активность андрогенного рецептора (AR) и эстрогенного рецептора (ER), что приводит к транскрипции генов, включая IGF1R, IRS-2, SGK1 и выживанию (AR) и циклина D1, c-мус и E2F1 (ER) соответственно. Он также усиливает транскрипционную активность c-Мус.

Экспрессия ATAD2 имеет высокий уровень в клетках некоторых видов опухолей, таких как рак мо-

лочной железы, рак предстательной железы и остеосаркома. Такая экспрессия связана с плохим прогнозом.

AVL9

Неожиданным образом, данный белок был обнаружен в качестве белка-источника. О белке AVL9 и функции соответствующего гена имеется лишь очень скудная и ограниченная информация.

Коллаген альфа-1 (XII) (Col12A1)

Коллаген альфа-1 (XII) является белком, аминокислотную последовательность альфа-1 цепи которого у человека кодирует ген COL12A1. Этот ген 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. Были идентифицированы альтернативные сплайс-варианты транскрипта, кодирующие различные изоформы.

Коллаген альфа-3(VI) (COL6A3)

Ген COL6A3 кодирует цепь альфа-3, одну из трех альфа-цепей коллагена типа VI. Как было продемонстрировано, белковые домены связываются с треками внеклеточного матрикса, что представляет собой взаимодействие, объясняющее значимость этого коллагена в организации компонентов матрикса. Ремоделирование внеклеточного матрикса посредством гиперэкспрессии коллагена типа VI вносит свой вклад в приобретение клетками рака яичника резистентности к цисплатину. Присутствие коллагена типа VI соотносилось со степенью злокачественности опухоли, прогностическим фактором для рака яичника (Sherman-Baust и соавт. 377-86). Ген COL6A3 экспрессирован в избытке в клетках колоректальных опухолей (Smith и соавт. 1452-64), карциноме слюнной железы (Leivo и соавт. 104-13) и по-разному экспрессирован в клетках рака желудка (Yang и соавт. 1033-40). 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 стадии опухолей (Thorsen и соавт. 1214-24).

Анемия Фанкони, комплементационная группа I (FANCI)

Белок FANCI локализуется в хроматин в ответ на повреждение ДНК и задействован в механизмах репарации ДНК (Smogorzewska и соавт. 289-301). Мутации гена FANCI приводят к анемии Фанкони, генетически гетерогенному рецессивному нарушению, характеризующемуся цитогенетической нестабильностью, гиперчувствительностью к агентам, сшивающим ДНК, увеличением разрывов хромосом и дефектной репарацией ДНК. Альтернативный сплайсинг FANCI приводит к двум транскрипционным вариантам, кодирующим различные изоформы.

Белок теплового шока массой 90кДа, бета, член 1 (HSP90B1)

HSP90 (известный также как регулируемый глюкозой белок 94, Grp94), член 1, является человеческим шаперонным белком. Он участвует в ассоциированных с ЭР (эндоплазматический ретикулум) процессах: трансляции, контроле качества белков и ЭР-ассоциированной деградацией (ERAD), ЭР-чувствительности к стрессу и связывании кальция/удерживании кальция в ЭР (Christianson и соавт. 272-82; Fu и Lee 741-44). HSP90 содержит последовательность KDEL, типичную для удерживаемых в ЭР белков, однако она также встречается на поверхности опухолевых клеток (Altmeyer и соавт. 340-49), в равной степени как и вне клеток. Также известно, что белки HSP (белки теплового шока) высвобождаются из некротических (но не апоптотических) клеток и клеток, подвергаемых различным видам стресса, таких как тепловой шок и оксидативный стресс, и их можно выявить в кровотоке (Basu и соавт. 1539-46; Tsan и Gao 274-79). Вне клеток белок HSP90 моделирует (в основном, стимулирует) иммунные ответы и задействован в презентации антигенов. На клеточной поверхности он может выполнять роль рецептора для вхождения патогена и/или для передачи сигнала (Cabanec и соавт. 2827-38). В случае опухолеспецифической экспрессии на поверхности клеток или высвобождения он может вызывать противоопухолевый иммунитет (Zheng и соавт. 6731-35). Основанные на HSP90 вакцины, как было показано, иммунизируют против рака и инфекционных заболеваний как в рамках профилактического, так и терапевтического введения (обзор дан в работе (Bolhassani и Rafati 1185-99; Castelli и соавт. 227-33; Murshid, Gong и Calderwood 1019-30)).

Однако белок HSP90 может также рассматриваться в качестве мишени для противоопухолевой терапии, поскольку 1) он соотносится с прогрессией опухоли и ведет к резистентности по отношению к апоптозу, также и при лучевой терапии или химиотерапии и 2) он экспрессирован в избытке во многих видах опухолей, включая РЖ, остеосаркому (Guo и соавт. 62-67), карциному молочной железы (Hodogova и соавт. 31-35). Гиперэкспрессия белка HSP90 связана с агрессивным поведением опухоли и плохим прогнозом при РЖ (Wang, Wang, и Ying 35-41; Zheng и соавт. 1042-49). Снижение уровня белка HSP90 при РЖ приводит к апоптозу раковых клеток (Sheu, Liu и Lan e1096).

Muc6

MUC6 экспрессируется клетками слизистой оболочки. Его основной функцией, как считается, является защита легко уязвимых поверхностей эпителия от вреда, наносимого постоянным воздействием широкого спектра эндогенных едких или протеолитических агентов (Toribara и соавт., 1997). MUC6 может

также играть роль при эпителиальном органогенезе (Reid и Haggis, 1999). Экспрессия MUC6 была обнаружена на нормальной слизистой оболочке желудка. Этот белок экспрессируется в избытке при некоторых видах рака, таких как аденома и карцинома кишечника, карцинома легких (Hamamoto и соавт. 891-96), колоректальные полипы (Bartman и соавт. 210-18) и карцинома молочной железы (Pereira и соавт. 210-13), тогда как он не экспрессируется в соответствующих нормальных тканях. Высокая экспрессия MUC6 в раковых опухолях слизистой оболочки, как предполагается, выступает в качестве барьера для распространения рака, приводя к менее агрессивному биологическому поведению (Matsukita и соавт. 26-36). Экспрессия MUC6 была ниже в клетках карцином желудка, чем в клетках аденом или нормальных слизистых тканях и обратно пропорционально взаимосвязана с размером опухоли, глубиной инвазии, инвазией лимфатических сосудов и вен, метастазами лимфатических узлов и стадиями по классификации UICC. Снижение уровня MUC6 может благоприятствовать злокачественной трансформации эпителиальных клеток желудка, лежать в основе роста, инвазии, метастазов и дифференциации карцином желудка (Zheng и соавт. 817-23). Существующие данные указывают также на то, что инфекция *Helicobacter pylori*, одна из наиболее частых причин карциномы желудка, связана с пониженной экспрессией MUC6 (Kang и соавт. 29-35; Wang и Fang 425-31).

Белок кинетохора Nuf2

Ген NUF2 (CDCA-1) кодирует белок, который очень похож на дрожжевой белок Nuf2, компонент консервативного белкового комплекса, связанного с центромерой. Дрожжевой Nuf2 исчезает из центромеры во время мейотической профазы, когда центромеры теряют свою связь с полярными тельцами веретена деления, и играет регуляторную роль в хромосомной сегрегации. Было продемонстрировано, что *csi*РНК сурвивина и *hNuf2* производят временный нокдаун своих мРНК, вызывая образование многоядерных клеток и клеточную смерть за счет митотического блока соответственно (Nguyen и соавт., 394-403). Nuf2 и Hec1 требуются для организации стабильных сайтов связывания плюс-конца микротрубочек на внешней пластине, которые необходимы для сохранения стабильных сил, направленных к полюсам, необходимых для биологической ориентации на кинетохорах (DeLuca и соавт., 519-31).

Было обнаружено, что белок Nuf2 экспрессируется в избытке в опухолях NSCLC, что связано с плохим прогнозом (Nayama и соавт. 10339-48), и тканях рака шейки матки (Martin и соавт. 333-59). На удаленных хирургической резекцией тканях рака желудка (диффузного типа, 6; кишечного типа, 4) два варианта белка NUF2 были в повышенном количестве. Предполагается, что варианты альтернативного сплайсинга, выявленные в этом исследовании, могут быть потенциально пригодны в качестве диагностических маркеров и/или новых мишеней для противораковой терапии (Ohnuma и соавт., 57-68).

Было обнаружено, что *si*РНК-опосредованный нокдаун NUF2 ингибирует клеточную пролиферацию и индукцию апоптоза при NSCLC, раке яичников, раке шейки матки, раке желудка, колоректальном раке и глиоме (Kaneko и соавт., 1235-40).

Липидная фосфат-фосфогидролаза 2 (PPAP2C)

Фосфатазы фосфатидной кислоты (PAP) преобразуют фосфатидную кислоту в диацилглицерин и принимают участие как в синтезе глицеролипидов *de novo*, так и в передаче активированного рецептором передачи сигнала, опосредованного фосфолипазой D. Сообщалось о трех вариантах альтернативного сплайсинга транскриптов, кодирующих различные изоформы. Активность PPAP2C повышена в трансформированных первичных зрелых мезенхимных стволовых клетках (MSC) взрослого человека и тканях многочисленных видов рака человека. Возможно, он требуется для повышения клеточной пролиферации. Гиперэкспрессия PPAP2C, но не каталитически неактивного мутанта, вызывала преждевременное вхождение в S-фазу, сопровождавшееся преждевременным накоплением циклина A. Нокдаун приводит к снижению клеточной пролиферации за счет задержания вхождения в фазу S (Flanagan и соавт. 249-60).

40S рибосомальный белок S11 (RPS11)

Рибосомы состоят из малых субъединиц 40S и больших субъединиц 60S. Вместе эти субъединицы образованы 4 видами РНК и приблизительно 80 различными по структуре белками. Ген RPS11 кодирует рибосомальный белок, который является компонентом субъединицы 40S. RPS11 был среди шести генов, обнаруженных во время скрининга на фекальные маркеры на основе РНК для диагностики колоректального рака. Он был обнаружен только в фекальных колоноцитах пациента, больного раком (Yajima и соавт. 1029-37).

E3 убиквитин-лигаза Seven in absentia, гомолога 2 (SIAH2)

SIAH2 является убиквитин-лигазой E3. Среди его субстратов находятся бета-катенин, TRAF2 и DCC (удален в клетках колоректального рака) (Habelhah и соавт. 5756-65; Hu и Fearon 724-32; Nakayama, Qi, и Ronai 443-51). SIAH2 ведет также к деградации ядерного белка герр86, приводя к отмене задержки в митозе, вызванного гиперэкспрессией этого белка (Szczepanowski и соавт. 485-90). SIAH2 имеет свойства, способствующие как развитию опухоли, так и метастазов по меньшей мере посредством двух сигнальных путей, обзор которых приводится в работе (Nakayama, Qi и Ronai 443-51): во-первых, он приводит к убиквитинированию и деградации белков в сигнальном каскаде гипоксии, который ведет к повышенной транскрипционной активности индуцируемых при гипоксии факторов (HIF) (Nakayama, Q и Ronai 443-51)(Calzadon соавт. 85-91). Во-вторых, он подавляет Sprouty2, специфический ингибитор сигнальной реакции Ras/ERK. Активность SIAH2 взаимосвязана с развитием опухоли поджелудочной желе-

зы, скорее всего, за счет его положительного влияния на Ras-сигнальный путь (Nakayama, Qi и Ronai 443-51).

Хотя роль SIAH2 при раке отчасти противоречива, в некоторых сообщениях показана связь низких уровней SIAH2 с плохим прогнозом или ответом на терапию (Confalonieri и соавт. 2959-68) (Jansen и соавт. 263-71), другие же указывают на его онкогенную функцию (Frasag и соавт. 13153-57). Ингибирование SIAH2 рассматривали в качестве противораковой терапии, так как он, как было продемонстрировано, ингибирует рост ксенотрансплантатов в моделях меланомы мыши (Qi и соавт. 16713-18; Shah и соавт. 799-808), клеточных линий рака легких человека, трансплантированных «голым» мышам (Ahmed и соавт. 1606-29).

Натрий- и хлорзависимый транспортер таурина (SLC6A6)

SLC6A6 является натрий- и хлорзависимым транспортером таурина (TauT) (Han и соавт., 2006). Мыши с нокаутом по гену тауринового транспортера (taut-/-) страдают от хронических заболеваний печени из-за недостаточности таурина, что может включать митохондриальную дисфункцию (Warskulat и соавт., 2006). Экспрессию SLC6A6 репрессирует ген-супрессор опухоли p53, и трансктивируют протоонкогены, такие как WT1, c-Jun и c-Myc. Избыточная экспрессия SLC6A6 защищает клетки почек от нефротоксичности, вызываемой цисплатином (Han и соавт., 2006; Han и Chesney, 2009). Экспрессия мРНК SLC6A6 поддерживалась на высоком уровне фактором некроза опухоли альфа (TNF-альфа) в клетках Caco-2 кишечного эпителия человека (Mochizuki и соавт., 2005).

Убихинонсвязывающий белок комплекса убихинол-цитохром-с-оксидоредуктаза (UQCRB)

Белок, кодируемый геном UQCRB, является частью комплекса убихинол-цитохром-с-оксидоредуктазы. Он связывается с убихиноном и участвует в переносе электронов. Мутации этого гена связаны с недостаточностью митохондриального комплекса III. Был описан псевдоген на X-хромосоме.

Ген UQCRB может быть потенциальным онкогеном или геном-супрессором опухоли при аденокарциноме протока поджелудочной железы (Harada и соавт., 13-24). Как было обнаружено, он экспрессируется в избытке клетками почечно-клеточной карциномы (Jia и соавт. 1133-39)

Рецептор 3 человеческого эпидермального фактора роста (ERBB3)

ERBB3 кодирует члена семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) рецепторных тирозинкиназ. Он активируется нейрегулинами, другими ERBB и рецепторами, не принадлежащими к ERBB, в равной степени как и другими киназами и новыми механизмами. По нисходящей он взаимодействует, главным образом, с фосфоинозитол-3-киназой/АКТ-каскадом, определяющим выживание клеток/митогенным каскадом, но и также с GRB, SHC, SRC, ABL, gasGAP, SYK и регулятором транскрипции EBP1 (Sithanandam и Anderson 413-48). Гиперэкспрессия ERBB3 была выявлена в клетках многих видов рака, включая рак желудка, при котором он может быть основной причиной заболевания и отрицательно влиять на прогноз (Kobayashi и соавт. 1294-301) (Slesak и соавт. 2727-32). (Zhang и соавт. 2112-18) обнаружили, что гиперэкспрессия ERBB3 может возникать более часто при диффузном типе (26,2%) рака желудка, чем при кишечном типе (5,0%). В обоих типах гиперэкспрессия соотносилась с плохим прогнозом. Подходы для нацеливания на ERBB3 в рамках противораковой терапии включают аптамеры РНК к внеклеточному домену (Chen и соавт. 9226-31), блокирование экспрессии его генов синтетическими факторами транскрипции (Lund и соавт. 9082-91), низкомолекулярные ингибиторы, как изомер витамина E γ -токотриенол (Samant и Sylvester 563-74), микроРНК (Scott и соавт. 1479-86) и siРНК (Sithanandam и соавт. 1847-59).

Проминин 1 (Prom1)

Функция: Проминин-1, называемый также CD133, был идентифицирован как молекула, специфическая для CD34+ кроветворных клеток-предшественников (Yip и соавт., 1997), и, как было показано позже, он является маркером для нормальных стволовых клеток и раковых стволовых клеток (РСК) различных тканей. Он находится в основном на выступах плазматической мембраны и может участвовать в организации топологии мембраны или в сохранении липидной композиции плазматической мембраны. Предполагалось, что сплайсинговая изоформа проминина-1, называемая AC133-2, в которой отсутствует небольшой экзон из 27 аминокислот, может представлять собой даже лучший маркер стволовых клеток (Miztak и соавт., 2008; Vidlingmaier и соавт., 2008).

Обычно только небольшой процент опухолевых клеток является положительным для проминина-1, как это ожидалось для маркера РСК. В зависимости от вида опухоли число положительных клеток на опухолевую массу достигает от 1 до 15% и в большинстве случаев составляет около 2%.

Проминин-1 имел взаимосвязь с образованием опухоли, ангиогенезом и устойчивостью к химическому воздействию (Zhu и соавт., 2009a) (Bruno и соавт., 2006; Hilbe и соавт., 2004) (Bertolini и соавт., 2009). Однако проминин-1-положительные клетки могут быть доступны для иммунной системы, так как они могут быть уничтожены НК-клетками (Castriconi и соавт., 2007; Pietra и соавт., 2009) и цитотоксическими Т-клетками (Brown и соавт., 2009).

Тогда как было продемонстрировано, что при многих видах рака проминин-1-положительные клетки являются функциональным маркером РСК, и экспрессия была часто связана с плохим прогнозом, до сих пор существует множество противоречий. В некоторых сообщениях утверждается, что он не является ни необходимым, ни достаточным для идентификации РСК (Cheng и соавт., 2009; Wu и Wu, 2009).

Вероятно, комбинация промнина-1 с другими молекулами, такими как CD44, или даже комбинации из множества компонентов, такие как prom1(+), CD34(+), CD44(+), CD38(-), CD24(-) служат лучшими маркерами РСК (Zhu и соавт., 2009b; Fulda и Pervaiz, 2010)

Предположение об экспрессии PROM1 при диффузном РЖ было основано на анализе *in silico* (Kato и Kato, 2007), о гиперэкспрессии при РЖ в сравнении с нормальной тканью желудка сообщалось в работе (Smith и соавт., 2008). Однако (Boegl и Prinz, 2009) сообщали, что уровень экспрессии промнина-1 был пониженным при РЖ, в частности на поздних стадиях, и заявляли, что экспрессия промнина-1 скорее взаимосвязана с ангиогенезом - который также снижается на поздних стадиях - чем с ростом опухоли. В исследовании с использованием клеточных линий РЖ (Takaishi и соавт., 2009) утверждается, что CD44, а не проминин-1, является маркером РСК при РЖ.

Матричная металлопротеиназа 11 (MMP11)

Подобно другим MMP, MMP11 - это эндопептидаза, задействованная в процессах, требующих ремоделирования тканей, таких как развитие, заживление ран и образование шрамов. Возможно, она также отрицательно регулирует гомеостаз жиров посредством снижения дифференциации адипоцитов. В отличие от других MMP, она не в состоянии расщеплять обычные молекулы внеклеточного матрикса - за исключением коллагена VI. Однако были идентифицированы другие субстраты, такие как альфа-2-макроглобулин, определенные ингибиторы серинпротеазы (серпины), включая альфа-1 антитрипсин, белок-1, связывающий инсулиноподобный фактор роста, и рецептор ламинина. При раке MMP11, в основном, экспрессируется клетками стромы, окружающими ткани опухоли. Это было продемонстрировано для многочисленных видов опухолей. Утверждалось, что MMP11 экспрессируется в избытке клетками стромы наиболее инвазивных карцином человека, но редко клетками сарком и других неэпителиальных опухолей. В большинстве, но не во всех случаях, MMP11 экспрессируется клетками стромы, непосредственно граничащими с опухолью, тогда как сами опухолевые клетки, нормальные ткани и стромальные клетки, расположенные далеко от опухоли, остаются отрицательными. Более высокие уровни MMP11 соотносятся со злокачественным фенотипом/более высокой инвазивностью и плохим прогнозом. Однако в клетках папиллярных карцином щитовидной железы экспрессия MMP11 была обратно пропорциональна агрессивным характеристикам. MMP11 была обнаружена в опухолевой ткани в равной степени, как в сыворотке пациентов, страдающих раком желудка, и уровень экспрессии соотносился с метастазами (Yang и соавт.). Более того, (Deng и соавт., 274-81) показали, что MMP11 высоко экспрессируется линиями опухолевых клеток и первичными опухолями рака желудка - в отличие от других видов рака не исключительно в строме - и что она, по-видимому, усиливает пролиферацию опухолевых клеток.

Ядерный транскрипционный фактор Y бета-субъединица (NFYB)

NFYB, называемый также CBF-B или CBF-A является, помимо NFYA и NFYC, частью гетеротримерного базального фактора транскрипции NF-Y (также CCAAT-связывающий фактор или CBF), который связывается с участками CCAAT - или противоположными участками, ATTGG, называемыми Y-боксы - в промоторных и энхансерных областях многочисленных генов. Среди генов-мишеней NF-Y находятся гены MHC II класса, бета-рецептор PDGF, несколько белков теплового шока, ген hMLH1 репарации ошибочно спаренных нуклеотидов и топоизомераза II альфа.

NFYB не является классическим онкогеном, однако его функция может иметь значение для онкогенеза. Во-первых, многие гены клеточного цикла, такие как циклин A, циклин B1, Aurora A и cdk1 являются мишенями NF-Y. Клетки задерживаются на фазе G2 / M без действия NFYB. (Park и соавт.) показывают, что повышенное количество циклина B2 и других связанных с клеточным циклом генов при колоректальной аденокарциноме вызвано активностью NF-Y. Во-вторых, активность NF-Y препятствует апоптозу. Клетки без NF-Y подвергаются апоптозу из-за активации p53 и снижения транскрипции антиапоптотических генов, содержащих CCAAT-боксы в своих промоторах, таких как Bcl-2 (Benatti и соавт. 1415-28). В-третьих, его онкогенные свойства усиливаются в комбинации с другими факторами транскрипции. Например, мутировавший p53 связывается с белками NF-Y и p300, увеличивая экспрессию NF-Y-индуцированных генов клеточного цикла.

ABL1

Протеин-тирозинкиназа C-Abl перемещается между ядерным и цитоплазматическим компартментами. Ядерный c-Abl задействован в ингибировании клеточного роста и апоптозе, тогда как цитоплазматический c-Abl может играть роль в динамике, связанной с актином, при морфогенезе, а также в сигнальных реакциях, вызванных внеклеточными стимулами, такими как факторы роста и лиганды интегринов. Цитоплазматический c-Abl, как сообщалось, способствует митогенезу.

Активность белка c-Abl регулируется отрицательно ее доменом SH3, и делеция домена SH3 превращает ABL1 в онкоген. При хронической миелоидной лейкемии (ХМЛ) ген активируется посредством транслокации внутри гена BCR (область точек разрыва) на хромосоме 22. Этот слитый белок BCR-ABL перемещается в цитозоль и позволяет клеткам пролиферировать без регуляции цитокинами (Zhao и соавт.). Активность c-Abl также повышена в случае солидных опухолей, как это было продемонстрировано для карцином молочной железы и NSCLC. Гиперэкспрессии недостаточно, и для конститутивной активности киназ требуется фосфорилирование белка. В клетках рака молочной железы фосфорилирование c-Abl вызывается тирозинкиназами плазматической мембраны, включая членов семейства SFK, EGFR и

рецептор IGF-1. Слитые белки ABL не были обнаружены в солидных опухолях (Lin и Arlinghaus, 2008). Было продемонстрировано, что ABL экспрессируют клетки карциномы желудка и связанные с ней микрососуды, позволяя предположить его возможное участие в ангиогенезе. Примечательно, что присутствующий в *H. pylori* цитотоксин-ассоциированный ген A (*CagA*) приводит к активации c-Abl, который, следовательно, фосфорилирует EGFR и, таким образом, блокирует эндоцитоз EGFR (Bauer, Bartfeld и Meyer 156-69). Несколько ингибиторов тирозинкиназы являются более или менее специфическими для Abl. Иматиниб (Gleevec) применяется в качестве терапии первой линии при ХМЛ и был также одобрен для лечения пациентов, имеющих желудочно-кишечные стромальные опухоли на поздних стадиях (GIST), так как его мишенью также является KIT (Pytel и соавт. 66-76) (Croom и Perry, 2003). Другие ингибиторы, используемые для лечения рака, - дазатиниб и нилотиниб (Pytel и соавт. 66-76) (Deremer, Ustun и Natarajan 1956-75).

Роло-подобная киназа 4 (Plk4)

Члены семейства киназ Polo (Plk1-4) важны во время деления клетки, регулируя несколько стадий митоза. Plk4 является "организатором" процесса образования и дупликации центриолей (Rodrigues-Martins et al. 1046-50). Тогда как Plk1 отчетливо является онкогеном, функция Plk4 при раке двузначна. Пониженный уровень в равной степени как и гиперэкспрессия Plk4 была связана с заболеванием раком у человека, мышей и мух (Cunha-Ferreira и соавт. 43-49). К примеру, при колоректальном раке была обнаружена гиперэкспрессия Plk4, однако у небольшой группы пациентов наблюдался сильно пониженный уровень Plk4 (Macmillan и соавт. 729-40). Это может объясняться тем фактом, что как гиперэкспрессия, так и недостаток Plk4 приводят к образованию дефектных центриолей, результатом чего становятся аномальное количество и структура centrosom, которые зачастую обнаруживаются в опухолевых клетках и способствуют отклонениям от обычного течения в митотическом цикле, что вызывает неправильное расхождение хромосом и анеуплоидию (Peel и соавт. 834-43). (Kuriyama et al. 2014-23). (Korzeniewski et al. 6668-75).

Белок 3, активирующий ГТФазу, имеющий IQ-мотив (IQGAP3)

IQGAP участвуют в сигнальных путях клеток, также как и в формировании архитектуры цитоскелета и в клеточной адгезии. Они имеют домен с последовательностью, сходной с RasGAPs и, соответственно, связываются с малыми ГТФазами. Однако (и вопреки своему названию) ни один из них не обладает ГТФаза-активирующей активностью. Для генов IQGAP1 и IQGAP2 было показано, что они стабилизируют связь ГТФазы с Rac1 и Cdc42, и, как предполагалось, IQGAP3 стабилизирует активированный Ras (Nojima и соавт. 971-78; White, Brown и Sacks 1817-24). С помощью своего IQ-домена они связываются с кальцием/кальмодулином, а с помощью кальпонин-гомологичного домена - с актиновыми филаментами (White, Brown и Sacks 1817-24). (Wang и соавт. 567-77) сообщают, что IQGAP3 экспрессируется в головном мозге, где он ассоциируется с актиновыми филаментами, а также с Rac1 и Cdc42. Он накапливается на периферических участках аксонов и способствует Rac1/Cdc42-зависимому разрастанию аксонов. IQGAP участвуют в развитии рака. IQGAP1 рассматривается как онкоген. Он усиливает связанные с раком сигнальные пути, такие как MAP-киназа, бета-катенин и VEGF-опосредованные сигнальные пути, и экспрессируется в избытке при многих видах опухолей. IQGAP2, как предполагается, скорее играет роль супрессора опухоли, и он был обнаружен в пониженном количестве при раке желудка с плохим прогнозом (White, Brown и Sacks 1817-24). О IQGAP3 имеется мало информации. (Skawran и соавт. 505-16) обнаружили, что он находится среди генов, которые имеют значительно повышенный уровень экспрессии в клетках почечно-клеточной карциномы. В двух исследованиях сообщается, что IQGAP3 специфически экспрессируют пролиферирующие клетки (Ki67+) тонкого кишечника, толстой кишки и печени мыши (Nojima и соавт. 971-78) (Kunimoto и соавт. 621-31).

Биспиральный домен, содержащий 88a (CCDC88A)

CCDC88A является актин-связывающим субстратом Akt, который играет роль при организации актиновых структур и Akt-зависимой подвижности клеток в фибробластах. Сигнальный путь CCDC88A/Akt также необходим для VEGF-опосредованного постнеонатального ангиогенеза.

CCDC88A экспрессируется также в больших количествах клетками различных злокачественных тканей человека, включая карциномы молочной железы, толстой кишки, легких и шейки матки. Он играет важную роль в прогрессии опухоли с aberrантной активацией Akt-сигнального пути.

Циклин В1 (CCNB1)

CCNB1 индуцируется во время G2/M фазы митоза и формирует митоз-стимулирующий фактор (MPF) вместе с циклин-зависимой киназой 1 (Cdk1)/Cdc2. Гиперэкспрессия была обнаружена в ряде различных видов рака и зачастую ассоциировалась с плохим прогнозом, например, при раке молочной железы (Aaltonen и соавт., 2009; Agarwal и соавт., 2009; Suzuki и соавт., 2007), медуллобластоме (de и соавт., 2008), немелкоклеточном раке легких (Cooper и соавт., 2009), раке шейки матки (Zhao и соавт., 2006) и других. Он был одним из генов, входящих в генетическую сигнатуру из 11 генов, которая, как было выявлено, предсказывает короткий временной интервал до начала рецидива заболевания у пациентов с 12 различными видами рака (Glinsky, 2006). Специфической информации для рака желудка найдено не было.

Циклин D2 (CCND2)

CCND2 связывается и активирует, как и другие циклины D-типа (D1 и D3), циклин-зависимую киназу 4 (Cdk4) или Cdk6. Это необходимо для перехода из G1 в S-фазу. Было обнаружено, что CCND2 экспрессируется в избытке клетками многих опухолей, включая опухоли семенника и яичников (Sicinski и соавт., 1996), гематологические злокачественные заболевания (Hoglund и соавт., 1996; Gesk и соавт., 2006) и рак желудка, который может быть вызван инфекцией *H. pylori*, и ассоциируется с плохим прогнозом (Yu и соавт., 2003). (Yu и соавт., 2001) (Oshimo и соавт., 2003) (Takano и соавт., 1999) (Takano и соавт., 2000).

Циклин E2 (CCNE2)

CCNE2 связывается и активирует, как и другие циклины E-типа, CCNE1, Cdk2. Эта активность достигает своего пика при переходе G1 в S-фазу. В здоровом состоянии CCNE2 не обнаруживается в покоящихся клетках и может встречаться только в активно делящихся тканях (Payton и Coats, 2002). Зачастую он аберрантно экспрессируется клетками при раке, например, при раке молочной железы и соотносится с плохим прогнозом (Desmedt и соавт., 2006; Ghayad и соавт., 2009; Payton и соавт., 2002; Sieuwerts и соавт., 2006) и при метастатическом раке предстательной железы (Wu и соавт., 2009).

Связанные с раковоэмбриональным антигеном молекулы клеточной адгезии 1, 5 и 6 (CEACAM 1, 5 и 6)

CEACAM - это прикрепленные к мембране гликопротеины, которые опосредуют взаимодействия между клетками и активируют сигнальные пути интегринов (Chan и Stanners, 2007). Они также могут служить рецепторами для патогенов, таких как *E. coli* (Berger и соавт., 2004) (Hauck и соавт., 2006), и быть задействованы в регуляции иммунной реакции (Shao и соавт., 2006).

CEACAM5 и CEACAM6 имеют проканцерогенное воздействие. Они ингибируют апоптоз (Ordenez и соавт., 2000), стимулируют развитие метастазов (Marshall, 2003; Ordenez и соавт., 2000) и разрушают поляризацию клеточных мембран и архитектуру тканей (Chan и Stanners, 2007). Роль CEACAM1 при раке двузначна. Он может быть супрессором на ранних стадиях и активно участвовать в образовании метастазов, ускользании опухоли от иммунного надзора и ангиогенезе на поздних стадиях (Hokari и соавт., 2007; Liu и соавт., 2007; Moh и Shen, 2009). Его функциональная роль зависит от изоформы, так как CEACAM1 встречается в 11 вариантах сплайсинга, соотношение которых определяет исход сигнальной реакции (Gray-Owen и Blumberg, 2006; Leung и соавт., 2006; Neumaier и соавт., 1993; Nittka и соавт., 2008). Соотношение вариантов сплайсинга может изменяться при заболевании раком (Gaug и соавт., 2008).

CEACAM5 или CEACAM6 или оба варианта экспрессируются в избытке клетками вплоть до 70% всех видов опухолей человека, что часто связано с плохим прогнозом (Chan и Stanners, 2007; Chevinsky, 1991). Сыворотка CEACAM5 является известным клиническим маркером для карциномы толстой и прямой кишки, высокие уровни указывают на плохой прогноз или рецидивы (Chevinsky, 1991; Goldstein и Mitchell, 2005). Также он предлагался в качестве маркера для других видов, включая рак желудка, однако с ограниченной прогностической силой (Victorzon et al., 1995). При раке CEACAM1 может быть представлен в пониженном или повышенном количестве в зависимости от вида опухоли (Kinugasa и соавт., 1998) (Dango и соавт., 2008) (Simeone и соавт., 2007). (Han и соавт., 2008) обнаружили повышенные уровни CEACAM5 и CEACAM6 в девяти видах раковых клеточных линий, тогда как CEACAM1 выявлен не был. Напротив, анализ образцов первичных опухолей 222 пациентов показал либо цитоплазматическое, либо мембранное окрашивание для CEACAM1. Связанная с мембраной форма соотносилась с повышенным ангиогенезом (Zhou и соавт., 2009). Исследование, проведенное (Kinugasa и соавт., 1998), также показало наличие повышенного уровня при аденокарциномах желудка.

В клетках некоторых видов опухолей уровень CEACAM1 понижен, что приводит к понижению уровня VEGF, а VEGF или гипоксия могут индуцировать CEACAM1 в непосредственно граничащем эндотелии. Соответственно, моноклональное антитело против CEACAM1 блокировало VEGF-индуцированное образование капилляроподобных структур эндотелия (Oliveira-Ferrer и соавт., 2004; Tilki и соавт., 2006; Ergun и соавт., 2000).

Помимо прочих, для подходов, основанных на использовании вакцин в качестве мишени для противораковых лекарственных препаратов испытанием подвергался в особенности CEACAM5. Эти исследования показали, что CEACAM5 может быть мишенью клеточных иммунных реакций (Cloosen и соавт., 2007; Marshall, 2003). Обзор T-клеточных эпитопов CEACAM5 приводится в работе (Sarobe и соавт., 2004).

Хлоридный канал 3 (CLCN3)

CLCN3 является Cl-каналом, который может быть гейтирован по объему и активно участвовать в регуляторном снижении объема (RVD), что происходит как реакция на увеличение клеточного объема в ходе клеточного цикла или в условиях гипосмоса (Lemonnier и соавт., 2004; Sardini и соавт., 2003). Однако, по этому поводу ведется противоречивая дискуссия (Wang и соавт., 2004), и активируемый во время апоптоза канал, уменьшающий объем, отличается от CLCN3 (Okada и соавт., 2006).

Экспрессия CLCN3 изменяется во время клеточного цикла, ее пик приходится на S-фазу (Wang и соавт., 2004). Потoki CLCN3 могут быть важны в связанных с раком процессах для видов опухолей, при

которых повышен уровень CLCN36, таких как глиома. Опухолевые клетки должны справляться с повышением пролиферационного объема, реагировать на гипоосмотические условия, например, при перитуморальном отеке (Ernest и соавт., 2005; Olsen и соавт., 2003; Sontheimer, 2008).

Более того, сообщалось, что CLCN3 усиливает резистентность к этопозиду, увеличивая подкисление позднего эндоцитического компартмента (Weylandt и соавт., 2007).

siРНК-опосредованный нокдаун CLCN3 снижал уровень миграции клеток носоглоточной карциномы *in vitro* (Мао и соавт., 2008).

DNAJC10

DNAJC10 является членом надмолекулярного комплекса ЭР-ассоциированной деградации (ERAD), который распознает и разворачивает неправильно свернутые белки в целях эффективной реализации ретроградного пути их ядерной транслокации (Ushioda и соавт., 2008). Как было показано, уровень этого белка был повышен при почечно-клеточной карциноме (Sunneа и соавт., 2007). Нокдаун DNAJC10 с помощью siРНК в клетках нейроэктодермальных опухолей усиливал апоптотический ответ на химиотерапевтический препарат фенретинид (Cоgazzаgи и соавт., 2007). Было продемонстрировано, что ERdj5 снижает выживаемость клеток нейробластомы при снижении реакции на присутствие несвернутых белков (UPR) (Thomas и Spyrou, 2009).

Эукариотический фактор инициации трансляции 2, гамма-субъединица 3 (EIF2S3)

EIF2S3 - самая крупная субъединица белкового комплекса (EIF2), производящая рекрутинг инициаторной метионил-тРНК в рибосомальную субъединицу 40S (Clemens, 1997). Действие киназ, которые снижают активность EIF, таких как РНК-зависимая протеинкиназа (PKR), может иметь проапоптотический характер и подавлять рост опухоли (Mounig и соавт., 2009). При раке желудка сообщалось о более высоких уровнях фосфорилированного и нефосфорилированного EIF2 и наблюдалось перераспределение в ядро. Это нарушение регуляции указывает на причастность eIF2alpha к заболеванию желудочно-кишечным раком (Lobo и соавт., 2000).

Эукариотический фактор инициации трансляции 3, субъединица L (EIF3L)

EIF3L является одной из 10-13 субъединиц EIF3, которые связаны с малой рибосомальной субъединицей. EIF3 играет роль в предупреждении преждевременного связывания большой рибосомальной субъединицы. EIF3L находится среди пяти субъединиц, о которых сообщалось, что они не обязательны для образования EIF3 (Masutani et al., 2007). Скрининг библиотеки антисмысловых последовательностей позволяет предположить, что низкий уровень экспрессии EIF3L усиливает антионкогенную активность 5-флуороурацила в клетках почечно-клеточной карциномы (Doh, 2008).

Эпиплакин 1 (EPPK1)

EPPK1 является геном семейства плакинов со многими неизвестными функциями. О генах плакина известно, что они задействованы в соединении филаментов цитоскелета и их закоривании на зоне склеивания плазматических мембран (Yoshida и соавт., 2008).

Рецептор 39, спаренный с G-белком (GPR39)

GPR39 - это рецептор, связанный с Gq-белком, который, как считается, задействован в работе желудочно-кишечного тракта и в процессах метаболизма (Yamamoto et al., 2009). Его сигнальный каскад активирует цАМФ и факторы транскрипции (Hoist и соавт., 2004). Эндогенным лигандом для GPR39, вероятно, является цинк (Chen и Zhao, 2007). GPR39 является новым ингибитором клеточной смерти, который, возможно, может представлять собой терапевтическую мишень и иметь причастность к процессам, охватывающим апоптоз и стресс эндоплазматического ретикулума, такой как рак (Dittmer и соавт., 2008). Было выявлено, что GPR39 экспрессируется на высоком уровне в микроматрицах на основе клеточной линии почки человеческих эмбрионов НФК, так и ксенотрансплантатов опухоли Вильмса с обогащением клеточной популяции опухолевыми клетками, по характеристикам схожими со стволовыми (Metsuyanin и соавт., 2009), и в клеточной линии гиппокампа, устойчивой к различным стимуляторам клеточной смерти (Dittmer и соавт., 2008).

ERBB2/HER2/NEU

ERBB3 является членом семейства рецепторных тирозинкиназ. Его лиганд неизвестен, но он является предпочтительным партнером по гетеродимеризации для других рецепторов семейства HER (Olayoуe, 2001). В карциномах HER2 выступает в качестве онкогена, в основном, из-за высокого уровня амплификации гена, вызывающего гиперэкспрессию белка в клеточной мембране и последующее приобретение злокачественной клеткой выгодных ей свойств (Slamon и соавт., 1989). Гиперэкспрессия наблюдалась в конкретном процентном соотношении во многих видах рака, включая рак желудка. В основном, это связано с плохим прогнозом (Song и соавт., 2010) (Yonemura и соавт., 1991) (Uchino и соавт., 1993) (Mizutani и соавт., 1993).

ERBB2 является мишенью моноклональных антител препарата трастузумаб (торговое название Герцептин (Herceptin)), который предлагали в качестве возможного лечения для пациентов, имеющих HER2-положительный рак желудка на поздней стадии, в комбинации с химиотерапией (Meza-Juncos и соавт., 2009; Van Cutsem и соавт., 2009). Другой препарат на основе моноклональных антител, пертузумаб, который ингибирует димеризацию рецепторов HER2 и HER3, находится на последних стадиях клинических испытаний (Kristjansdottir и Dizon, 2010). Селективная гиперэкспрессия HER2 и HER3 в двух

гистологических типах рака желудка (диффузного и кишечного типа) тесно взаимосвязана с плохим прогнозом (Zhang и соавт., 2009).

Бета-4 интегрин (ITGB4)

Интегрины опосредуют межклеточную адгезию в равной степени как и двунаправленную передачу регуляторных сигналов из клетки в клетку. Субъединица интегрин бета-4 гетеродимеризуется с субъединицей альфа-6. Возникающий в результате интегрин способствует образованию гемидесмосом между внутриклеточным кератиновым цитоскелетом и базальной мембраной (Giancotti, 2007). Интегрин бета-4 имеет двойную функцию при раке, так как он может опосредовать стабильную адгезию, с одной стороны, и проинвазивные сигнальные реакции (включая сигнальные пути Ras/Erk и PI3K) и ангиогенез, с другой стороны (Giancotti, 2007; Raymond и соавт., 2007). Он экспрессируется в избытке клетками многих опухолей, в равной степени как и ангиогенными клетками эндотелия, и зачастую соотносится с прогрессией и метастазами. О высоких уровнях сообщалось в случае рака желудка, в особенности в поражающих строму клетках (Giancotti, 2007; Tani и соавт., 1996). Однако его уровень был пониженным в недифференцированной карциноме желудка, так как опухоль распространилась глубже, вероятно, вследствие постепенного эпителиально-мезенхимального перехода, поскольку бета-4 интегрин является эпителиальным интегрином (Yanchenko и соавт., 2009).

Липокалин (LCN2)

LCN2 или желатиназа-ассоциированный липокалин нейтрофилов (NGAL) является регуляторным белком железа, который существует как мономер, гомодимер или как гетеродимер с дисульфидной связью с MMP9 (Coles и соавт., 1999; Kjeldsen и соавт., 1993). Уровень экспрессии повышен в нескольких видах рака, ассоциируясь в некоторых случаях с прогрессией. С точки зрения механизма, это может стабилизировать MMP9 и изменять E-кадгерин-опосредованную межклеточную адгезию, тем самым усиливая инвазию. Комплексы MMP-9 и LCN2 соотносились с ухудшением выживаемости при раке желудка (Kubben и соавт., 2007) (Ни и соавт., 2009). Хотя наблюдался четкий благоприятный развитию опухоли эффект во многих опухолях человека, некоторые клинические исследования показали, что LCN2 может ингибировать стимулирующий неоплазмы фактор HIF-1-альфа, фосфорилирование FA-киназы, а также синтез VEGF, таким образом, позволяя предположить, что в альтернативных условиях LCN2 также, как это ни парадоксально, оказывает противоопухолевое и антиметастатическое влияние на новообразование, например, в толстой кишке, яичнике и поджелудочной железе. (Bolognino и соавт., 2009; Tong и соавт., 2008), LCN2 может быть пригоден для ингибирования ангиогенеза, связанного с опухолью, в дополнение к подавлению опухолевых метастазов в раковых заболеваниях, при которых происходит активация gas (Venkatesha и соавт., 2006).

Комплекс сукцинатдегидрогеназы, субъединица C (SDHC) SDHC является одной из четырех кодируемых ядром субъединиц сукцинатдегидрогеназы (митохондриальный комплекс II), которая перемещает электроны из сукцината в убихинон с получением фумарата и убихинола. Недостаток сукцинатдегидрогеназы может вызвать желудочно-кишечные стромальные опухоли (GIST) (McWhinney et al., 2007). Наследственные желудочно-кишечные стромальные опухоли могут быть вызваны мутациями в генах субъединицы SDHB, SDHC и SDHD, и параганглиомы в брюшной полости, связанные с желудочно-кишечными опухолями, могут возникать исключительно в результате мутаций в SDHC (Pasini и соавт., 2008). Белковый продукт мутантного SDHC у трансгенных мышей вызывает окислительный стресс и может участвовать в повреждении ядерной ДНК, мутагенезе и, в конечном итоге, онкогенезе (Ishii и соавт., 2005). Сукцинатдегидрогеназа рассматривается как супрессор опухоли (Baysal, 2003; Gottlieb and Tomlinson, 2005). Пониженные уровни этого ферментативного комплекса могут привести к онкогенезу (Eng и соавт., 2003).

Киназа с PDZ-связывающим мотивом (РВК)

РВК является MEK3/6-связанной MAPKK, которая активирует p38 MAP киназу, например, после рецепторов фактора роста (Abe и соавт., 2000; Ayllon и O'connor, 2007). JNK может быть вторичной мишенью (Oh и соавт., 2007). Поскольку у взрослых РВК экспрессируется в семеннике (см. ниже), то было высказано предположение, что она участвует в сперматогенезе (Abe и соавт., 2000; Zhao и соавт., 2001). Кроме того, она способствует пролиферации и резистентности к апоптозу опухолевых клеток. Она фосфорилируется и активируется во время митоза, который необходим для образования веретена деления и цитокинеза (Gaudet и соавт., 2000; Matsumoto и соавт., 2004; Park и соавт., 2009) (Abe и соавт., 2007). Другие функции, способствующие росту и направленные против апоптоза, включают ограничение экспрессии p53 и фосфорилирование гистонов (Park и соавт., 2006; Zyкова и соавт., 2006) (Nandi и соавт., 2007). РВК был классифицирован как раково-тестикулярный антиген (Abe и соавт., 2000; Park и соавт., 2006) и, как было выявлено, он экспрессируется в избытке при многих видах рака.

ДНК-полимераза, дельта 3, вспомогательная субъединица (POLD3)

Комплекс ДНК-полимеразы дельта задействован в репликации и репарации ДНК. Он состоит из ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), фактора репликации мульти-субъединицы C, и 4 субъединиц полимеразного комплекса: POLD1, POLD2, POLD3, и POLD4 (Liu и Warbrick, 2006). POLD3 играет ведущую роль в эффективной реактивации PCNA во время циклов диссоциации и ассоциации POL-дельта во время стадии элонгации репликации ДНК (Masuda и соавт., 2007).

26S протеасома (просома, макропен), неАТФазная субъединица 14 (PSMD14)

PSMD14 является компонентом 26S протеасомы. Она входит в комплекс 19S (19S cap; PA700), который отвечает за деубиквитинирование субстрата во время протеасомной деградации (Spataro и соавт., 1997). Гиперэкспрессия PSMD14 в клетках млекопитающих влияет на клеточную пролиферацию и реакцию на цитотоксические препараты, такие как винбластин, цисплатин и доксорубин (Spataro и соавт., 2002). Подавление PSMD14 в клетках HeLa с помощью siРНК приводило к снижению жизнеспособности клетки и увеличению уровня полиубиквитинированного белка (Gallery и соавт., 2007). Снижение уровня PSMD14 с помощью siРНК имело существенное влияние на жизнеспособность клеток, вызывая задержку клеток на фазе G0-G1, что в конце концов, приводит к старению (Вугне и соавт., 2010).

26S протеасома (просома, макропен), АТФазная субъединица 2 (PSMC2)

PSMC2 является частью системы 26S протеасомы. Это член семейства АТФаз ААА, который проявляет шаперонподобную активность. Эта субъединица, как было продемонстрировано, взаимодействует с несколькими базальными факторами транскрипции, так что в дополнение к участию в функциях протеасомы, эта субъединица может участвовать в регуляции транскрипции. Было продемонстрировано, что в скелетной мышце 26S протеасомная система может активироваться с помощью TNF-альфа (Tan и соавт., 2006). У HBx трансгенных мышей, которые являются носителями регуляторного гена HBx гепатита В в своей зародышевой линии, и у которых развивается почечно-клеточная карцинома, PSMC2 и другие протеасомные субъединицы экспрессируются на высоком уровне в опухолевых тканях (Cui и соавт., 2006). Уровни мРНК для субъединицы АТФазы PSMC2 комплекса 19S повышались при раковой кахексии (Combareт и соавт., 1999).

Протеин-тирозинкиназа 2 (РТК2)

РТК2 является нерецепторной тирозинкиназой, которая моделирует сигнальные пути интегрин и может способствовать опухолевому росту, прогрессии и метастазам ((Giaginis и соавт., 2009); (Hauck и соавт., 2002); (Zhao и Guan, 2009)). Было сделано предположение, что РТК2 является маркером онкогенеза и прогрессирования рака (Su и соавт., 2002; Theocharis и соавт., 2009; Jan и соавт., 2009). Гиперэкспрессия и/или повышенная активность имеется в широком спектре видов рака человека, включая рак желудка. РТК2 также передает сигналы по нисходящей от рецептора гастрин, который содействует пролиферации клеток рака желудка (Li и соавт., 2008b). Как было показано, 8% карцином желудка являлись носителями вируса Эпштейна-Барра (EBV). Для инфицированных вирусом EBV подлинных клеточной линии рака желудка человека было характерно повышенное фосфорилирование с участием РТК2 (Kassis и соавт., 2002). Уровень фосфорилирования РТК2-тирозина в клетках эпителия желудка снижается в случае cagA-положительного продукта *Helicobacter pylori*.

Тетраспанин 1 (TSPAN1) и тетраспанин 8 (TSPAN8)

TSPAN1 и TSPAN8 принадлежат к семье тетраспанинов, которые характеризуются четырьмя трансмембранными доменами и внутриклеточным N- и C-концом и которые играют роли во множестве процессов, включая клеточную адгезию, подвижность, активацию и опухолевую инвазию. Они часто образуют крупные молекулярные комплексы с другими белками, такими как интегрины на клеточной поверхности (Tagant и соавт., 2003; Serru и соавт., 2000). Функции TSPAN1 до сих пор неизвестны и могут включать роль в секреции (Scholz и соавт., 2009). TSPAN1 гиперэкспрессируется клетками нескольких видов рака и зачастую соотносится со стадией, прогрессией и худшим клиническим исходом. Примечательно, что о нем сообщалось, что он экспрессирован в избытке в 56,98% из 86 случаев карциномы желудка, и гиперэкспрессия положительно соотносилась с клинической стадией, инфильтрацией и статусом лимфатических узлов и отрицательно соотносилась с уровнем выживаемости и степенью дифференциации опухоли (Chen и соавт., 2008). О TSPAN8 сообщалось как о связанном с метастазами гене во многих видах опухолей (PMID: 16467180). При раке желудочно-кишечного тракта экспрессия TSPAN8 связана с плохим прогнозом (PMID: 16849554).

Белок цинковые пальцы 598 (ZNF598)

ZNF598 - это цинковый палец с еще не известной функцией.

Дизинтегрин и металлопротеиназа 10 (ADAM 10)

ADAM10 играет роль при ангиогенезе, развитии и онкогенезе. Они гиперэкспрессируются в карциноме желудка. Селективные ингибиторы ADAM-10 проходят сейчас клинические исследования для лечения рака. (PMID: 19408347)

Матричная металлопротеиназа 12 (MMP12)

MMP12 - это цинкзависимая эндопептидаза, которая расщепляет эластин и множество других матричных и нематричных белков и задействована в миграции макрофагов и ингибировании ангиогенеза (Chakraborti и соавт., 2003; Chandler и соавт., 1996; Sang, 1998). Она также играет роль в патологических процессах с разрушением тканей, таких как астма, эмфизема и хроническое обструктивное заболевание легких (ХОБЛ), ревматоидный артрит и рост опухоли (Cataldo и соавт., 2003; Wallace и соавт., 2008). Обсуждается применение ингибиторов MMP12 в качестве препаратов для лечения указанных заболеваний (Churg и соавт., 2007; Norman, 2009). MMP12 зачастую экспрессируется в избытке при раке, где ее функции неоднозначны. Наряду с тем, что она может быть задействована в растворении матрикса, и таким образом, возникновении метастазов, она также может ингибировать рост опухоли посредством выработ-

ки ангиостатина, который отрицательно воздействует на ангиогенез. Об усиленной экспрессии MMP12 сообщалось для РЖ, и, как было показано, это имеет благоприятное влияние: она отрицательно соотносится с плотностью микрососудов, VEGF, степенью дифференциации опухоли, инвазией в кровеносные сосуды, метастазами в лимфатических узлах и рецидивами. Пациенты с избыточной экспрессией MMP12 демонстрировали существенно лучшую выживаемость (Cheng и соавт., 2010; Zhang и соавт., 2007b; Zhang и соавт., 2007a)

Рибонуклеотидная редуктаза M2 (RRM2)

RRM2 является одной из субъединиц рибонуклеотидной редуктазы, которая образует дезоксирибонуклеотиды из рибонуклеотидов. Гиперэкспрессия RRM2 наблюдалась в опухолях, включая рак желудка, и она усиливает метастатический потенциал (PMID: 18941749) (PMID: 19250552) Нокдаун RRM2 за счет siPHK замедлял рост опухоли у различных биологических видов (мышь, крыса, обезьяна) (PMID: 17929316; PMID: 17404105).

Трансмембранная протеаза, серин 4 (TMPRSS4)

TMPRSS4 представляет собой трансмембранную серин-протеазу типа II, обнаруженную на клеточной поверхности, которая высоко экспрессирована в тканях нескольких видов опухолей, включая рак поджелудочной железы, толстой кишки и желудка. Биологические функции TMPRSS4 при раке до сих пор не известны. TMPRSS4 имеет четыре сплайсинговых варианта (Scott и соавт., 2001; Sawasaki и соавт., 2004). Экспрессия в карциноме яичника соотносилась со стадией (Sawasaki и соавт., 2004). Уровень TMPRSS4 сильно повышен в тканях рака легких, и нокдаун TMPRSS4 за счет siPHK с помощью введения малой интерферирующей РНК в клеточные линии рака легких и толстой кишки был связан со снижением клеточной инвазии и адгезии клеток матрикса, в равной степени как и моделированием клеточной пролиферации (Jung и соавт., 2008).

Йодотиронин-дейодиназа, типа II (DIO2)

DIO2 преобразует прогормон тироксин (Т4) в биологически активный 3,3',5-трийодтиронин (Т3). Он высоко экспрессируется в щитовидной железе, и было выявлено, что его экспрессия и/или его активность дерегулирована при раке щитовидной железы (de Souza Meyer и соавт., 2005) (Arnaldi и соавт., 2005). Однако он также был обнаружен в других тканях, таких как нормальные ткани легких и ткани рака легких (Wawrzynska и соавт., 2003), и опухолях головного мозга (Murakami и соавт., 2000).

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

IGF2BP3, в первую очередь, присутствует в ядре, где он связывается с мРНК гена IGF2 и подавляет его транскрипцию. Он играет роль в эмбриогенезе и уровень его экспрессии снижается во взрослых тканях. В опухолевых клетках уровень его экспрессии может быть повышенным и, таким образом, он рассматривается как онкофетальный белок (Liao и соавт. 2005). Его избыточная экспрессия была выявлена в клетках многих видов рака, включая рак желудка, что связано с плохим прогнозом (Jeng и соавт. 2009)(Jiang и соавт. 2006). Пептиды, полученные из IGF2BP3, были испытаны в клинических исследованиях вакцин (Копо и соавт. 2009).

Ламин В1 (LMNB1)

Ламин В1 является белком ядерного ламинового матрикса, и он участвует в обеспечении стабильности клеточного ядра, в хроматиновых структурах и в экспрессии генов. На ранних стадиях апоптоза ламин расщепляется (Neamati и соавт. 1995) (Sato и соавт. 2008b; Sato и соавт. 2008a; Sato и соавт. 2009). LMNB1 экспрессируется до некоторой степени, по существу, всеми нормальными соматическими клетками, и предварительные исследования указывают, что его уровень может быть пониженным во время патологических процессов при некоторых видах рака, включая рак желудка (Moss и соавт. 1999). В других видах рака, таких как почечно-клеточная карцинома, был выявлен повышенный уровень LMNB1, который положительно соотносился со стадией развития опухоли, размером и числом пораженных лимфоузлов (Lim и соавт. 2002).

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

WNT5A является секретруемым сигнальным белком, участвующим в процессах развития и онкогенезе. Канонический сигнальный путь с участием WNT5A за счет рецепторов Frizzled и LRP5/LRP6 ведет к сохранению стволовых клеток/предшественников, тогда как неканонический сигнальный путь с участием WNT5A за счет рецепторов Frizzled и ROR2/PTK/Ryk контролирует полярность тканей, клеточную адгезию или движение, например, в месте контакта опухоли и стромы, приводя к инвазии (Katoh и Katoh, 2007). Он может выступать в роли супрессора опухоли в некоторых видах рака, однако экспрессируется на высоком уровне в других видах, включая рак желудка, где он содействует прогрессии и метастазам и приводит к плохому прогнозу (Li и соавт., 2010) (Yamamoto и соавт., 2009) (Kurayoshi и соавт., 2006).

Белок активации фибробластов, альфа (FAP)

FAP является интегральной мембранной желатиной. Его предполагаемая серин-протеазная активность может играть роль при контроле роста фибробластов или в эпителиально-мезенхимальных взаимодействиях во время развития, репарации тканей и эпителиального онкогенеза (Scanlan и соавт. 1994). FAP играет важную роль в росте опухоли, метастазах и ангиогенезе посредством клеточной адгезии и

миграционных процессов, в равной степени как и быстрой деградации компонентов внеклеточного матрикса (ECM). Он присутствует на опухолевых клетках, поражающих ECM, в реактивных фибробластах, связанных с раком, и эндотелиальных клетках, задействованных в ангиогенезе, но не в неактивных клетках того же типа. (Dolznic и соавт. 2005; Kennedy и соавт. 2009; Rettig и соавт. 1993; Rettig и соавт. 1994; Scanlan и соавт. 1994; Zhang и соавт. 2010). Экспрессия FAP была выявлена в клетках рака желудка и была связана со стромальными фибробластами (Zhi и соавт. 2010) (Chen и соавт. 2006) (Mori и соавт. 2004; Okada и соавт. 2003). В модели с мышами было показано, что FAP-экспрессирующие клетки являются обязательным иммуносупрессивным компонентом опухолевого микроокружения (Kraman и соавт. 2010). В экспериментах по противоопухолевой вакцинации на моделях с мышами FAP успешно использовался в качестве мишени для CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточных ответов (Loeffler и соавт. 2006; Wen и соавт. 2010) (Lee и соавт. 2005) (Fassnacht и соавт. 2005).

Коатомерный комплекс белков, субъединица гамма (COPG);

Коатомерный комплекс белков, субъединица гамма 2 (COPG2);

Коатомерный комплекс белков, субъединица бета 1 (COPB1);

COPG, COPG2 и COPB1 являются субъединицами коатомерного комплекса, называемого также комплексом белков оболочки 1 (COP1), который связан с не покрытыми клатрином везикулами. COP1-покрытые везикулы опосредуют ретроградный транспорт из аппарата Гольджи, назад в ЭР и транспорт внутри аппарата Гольджи (Watson и соавт., 2004). Они также могут быть задействованы в anterogradном транспорте (Nickel и соавт., 1998). Ретроградный перенос регулирует, помимо прочего, EGF (эпидермальный фактор роста)-зависимый ядерный транспорт рецептора EGFR, который связывается с COPG (Wang и соавт., 2010). Было показано, что COPG был экспрессирован в избытке в клетках рака легких и связанных с раком легких эндотелиальных клетках капилляров (Park и соавт., 2008).

Последовательность повсеместно экспрессированного COPG2 на 80% идентична GOPG (Blagitko и соавт., 1999). COPG2 может образовывать COP I-подобный комплекс вместо GOPG, который, вероятно, является функционально излишним (Futatsumori и соавт., 2000).

Нокдаун COPB1 в клеточной линии, экспрессирующей ген трансмембранного регулятора при муковисцидозе (CFTR), позволяет предположить, что коатомерный комплекс задействован в транспорте CRTR в плазматическую мембрану (Denning и соавт., 1992) (Bannykh и соавт., 2000).

Убиквитин-конъюгирующий фермент E2S (UBE2S)

UBE2S является вспомогательным фактором комплекса, стимулирующего анафазу (APC), E3 убиквитинлигазой, которая регулирует выход из митотического цикла и фазы G1 при нацеливании на регуляторы клеточного цикла. UBE2S удлиняет убиквитиновые цепи после того, как субстраты прошли предварительное убиквитинирование другими компонентами (Wu и соавт., 2010). UBE2S также нацеливается на белок VHL для протеасомной деградации, тем самым стабилизируя HIF-альфа (Lim и соавт., 2008), и, возможно, способствуя пролиферации, эпителиально-мезенхимальному переходу и возникновению метастазов (Chen и соавт., 2009) (Jung и соавт., 2006). UBE2S экспрессируется в избытке в нескольких формах рака.

Член семейства кинезинов 11 (KIF11)

KIF11 необходим для образования биполярного митотического веретена. Его повышенные уровни были выявлены в нескольких видах рака, зачастую сопряженные с клинико-патологическими параметрами (Liu et al., 2010) (Peure et al., 2010). Небольшие молекулы ингибиторов KIF11, такие как S-третил-L-цистеин (STLC), разработанные как потенциальные противораковые средства, задерживают клетки в фазе митоза и способствуют апоптозу раковых клеток (Tsui и соавт., 2009) (Wiltshire и соавт., 2010) (Ding и соавт., 2010). В клинических условиях было показано, что ингибиторы KIF11 проявляют лишь незначительную активность (Kaan и соавт., 2010; Tunquist и соавт., 2010; Wiltshire и соавт., 2010; Zhang и Xu, 2008).

Домен 8 дезинтегрин и металлопротеиназы (ADAM8)

Сначала ADAM8 рассматривали как иммуноспецифический ADAM, но он был обнаружен и на других видах клеток, зачастую при условиях, включающих воспаление и ремоделирование ECM, включая рак и такие заболевания дыхательных путей, как астма (Koller и соавт. 2009). Многие виды ADAM, включая ADAM8, экспрессируют клетки злокачественных опухолей человека, в которых они участвуют в регуляции активности фактора роста и функций интегрин, способствуя росту клеток и инвазии, хотя точные механизмы их действия на данный момент не ясны (Mochizuki и Okada 2007). В опухолях желудка мышей наблюдался повышенный уровень ADAM8 и других видов ADAM, вероятно, в связи с усилением передачи сигналов рецептором EGFR (Oshima и соавт. 2011).

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

CDC6 необходим для ингибирования инициации репликации ДНК. Он находится в ядре во время фазы G1, но перемещается в цитоплазму в начале фазы S. CDC6 также регулирует активацию репликации в сверхочной точке за счет взаимодействия с ATR (Yoshida и соавт. 2010). Нарушение регуляции CDC6 может вызвать инактивацию локуса INK4/ARF, кодирующего три важных гена-супрессора опухоли: p16INK4a и p15INK4b, оба являющихся активаторами сигнального пути ретинобластомы, и ARF, активатора p53 (Gonzalez и соавт. 2006). Нокдаун CDC6 с помощью siPHK мог предотвратить пролифе-

рацию и способствовал апоптозу (Lau и соавт. 2006). CDC6 представлен в повышенном количестве в раковых клетках, включая рак желудка (Nakamura и соавт. 2007) (Tsukamoto и соавт. 2008).

Рецептор фактора коагуляции F2R II (тромбин) (F2R)

F2R, называемый также активируемым протеиназой рецептором (PAR1), является рецептором, связанным с G-белком. Сигналы PAR1, PAR2 и PAR4 могут регулировать высвобождение кальция или активацию митоген-активируемой протеинкиназы и вести к накоплению тромбоцитов, релаксации сосудов, клеточной пролиферации, высвобождению цитокинов и воспалению (Oikonomopoulou и соавт. 2010). Считается, что F2R задействован в пролиферации эндотелиальных и опухолевых клеток и в ангиогенезе, и он экспрессируется в избытке в инвазивных и метастатических опухолях многих видов. Уровни экспрессии напрямую соотносятся со степенью инвазивности рака (García-Lopez и соавт. 2010) (Lurje и соавт. 2010). В клетках карциномы желудка активация F2R может запускать каскад реакций, которые способствуют росту и инвазии опухолевых клеток, например, гиперэкспрессию NF-κappaB, EGFR и тенасцина-С (TN-C) (Fujimoto и соавт. 2010). Соответственно, как было установлено, экспрессия F2R в клетках рака желудка соотносится с глубиной инвазии в стенки, диссеминацией в брюшной полости и плохим прогнозом (Fujimoto и соавт. 2008). Было описано мышиное моноклональное антитело (ATAP-2) к человеческому PAR1, которое распознает эпитоп (SFLLRNPN) на N-конце рецептора тромбина, а также пептидный агонист рецептора PAR1 - пептид TFLLRNPNDK (Hollenberg и Compton 2002; Mari и соавт. 1996; Xu и соавт. 1995)

Ольфактомедин 4 (OLFM4)

Белок OLFM4, функция которого во многом неизвестна, экспрессируется в избытке в воспаленном эпителии толстой кишки и в ряде различных опухолей человека, в особенности опухолей пищеварительной системы (Koshida и соавт., 2007). OLFM4 является стабильным маркером для стволовых клеток кишечника человека и метит субпопуляцию клеток колоректального рака (van der Flier и соавт., 2009). OLFM4 ингибирует способствующий апоптозу белок GRIM-19 (Zhang и соавт., 2004) (Huang и соавт., 2010), регулирует клеточный цикл и способствует переходу в S-фазу при пролиферации раковых клеток. Кроме того, OLFM4 связан с адгезией раковых клеток и метастазированием (Yu и соавт., 2011b). Усиленная гиперэкспрессия OLFM4 в клетках опухоли предстательной железы у мышей вела к более быстрому образованию опухоли у животных с сингенным трансплантатом (Zhang и соавт., 2004). Гиперэкспрессия OLFM4 была выявлена в РЖ (Aung et al., 2006). Ингибирование экспрессии OLFM4 могло индуцировать апоптоз в присутствии цитотоксических веществ в клетках рака желудка (Kim et al., 2010). Также повышенной была концентрация OLFM4 в сыворотке пациентов перед операцией с диагнозом РЖ в сравнении со здоровыми донорами (Oue и соавт., 2009). OLFM4 был идентифицирован в качестве нового гена-мишени для ретиноевых кислот (RA) и деметилирующего агента 5-аза-2'-дезоксцитидина. Было подтверждено, что эти два агента являются эффективными при лечении определенных пациентов, страдающих миелоидной лейкемией (Liu и соавт., 2010).

Thy-1 поверхностный клеточный антиген (THY1)

Thy-1 (CD90) является заякоренным на GPI гликопротеином, выявленным во многих видах клеток, включая Т-клетки, нейроны, клетки эндотелия и фибробласты. Thy-1 участвует в таких процессах, как адгезия, обновление нервной ткани, рост опухоли, подавление опухоли, миграция, клеточная смерть и активация Т-клеток. (Rege и Hagood 2006b; Rege и Hagood 2006a) (Jurisic и соавт. 2010). Thy-1, по видимому, является маркером ангиогенеза у взрослых, но не на эмбриональной стадии (Lee и соавт. 1998). Более того, он рассматривался в качестве маркера для различных видов стволовых клеток (мезенхимальных стволовых клеток, стволовых клеток печени ("овальные клетки") (Masson и соавт. 2006), стволовых клеток кератиноцитов (Nakamura и соавт. 2006) и кроветворных стволовых клеток (Yamazaki и соавт. 2009)). Уровень экспрессии Thy-1 повышен в нескольких видах рака, включая рак желудка и опухоли GIST, для которых его предлагали в качестве маркера (Yang и Chung 2008; Zhang и соавт. 2010) (Oikonomou и соавт. 2007).

Центросомный белок 250 кДа (CER250)

Cer250 играет роль при когезии центров организации микротрубочек (Mauro и соавт., 2000). Его также называют центросомным Nek2-ассоциированным белком или C-Nap1, так как он локализуется совместно с серин/треонинкиназой Nek2 и является ее субстратом. Киназа Nek2 и ее субстраты регулируют сцепление центросом (Bahmanpour и соавт., 2008). В начале фазы митоза, когда центросомы разделяются для образования биполярного веретена, C-Nap1 фосфорилируется и, затем, отделяется от центросом. В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что гиперэкспрессия Cer250 повреждает организацию микротрубочек на центросоме (Mauro и соавт., 2002).

Индукцируемый при гипоксии фактор-1, субъединица альфа (основной фактор транскрипции с доменом типа спираль-петля-спираль) (HIF1A)

HIF1A является чувствительной к кислороду субъединицей индуцируемого при гипоксии фактора (HIF) - транскрипционного фактора, активного в условиях гипоксии, свойственных для опухолей. Он опосредует транскрипцию более 60 генов, задействованных в процессах выживаемости, метаболизма глюкозы, инвазии, распространения метастазов и ангиогенеза (например, VEGF). Ген HIF1 экспрессируется в избытке клетками многих видов рака, что часто связано с плохим прогнозом, и он рассматривается

как интересная мишень для фармакологических манипуляций (Griffiths и соавт. 2005; Quintero и соавт. 2004; Stoeltzing и соавт. 2004) (Zhong и соавт. 1999).

При раке желудка HIF1A участвует в ангиогенезе (Nam и соавт. 2011), соотносится с размером опухоли, более низкой дифференциацией, стадией опухоли, более короткой выживаемостью (Qiu и соавт. 2011) и метастазами (Wang и соавт. 2010) (Han и соавт. 2006; Kim и соавт. 2009; Oh и соавт. 2008; Ru и соавт. 2007). Также считается, что он приводит к возникновению резистентности к химиотерапевтическим средствам, таким как 5-FU, за счет ингибирования апоптоза, вызванного лекарственными препаратами, и снижения внутриклеточного накопления препарата (Nakamura и соавт. 2009) (Liu и соавт. 2008). HIF-1 альфа-ингибитор 2-метоксиэстрадиол в значительной степени снижал метастатические свойства клеток рака желудка (Rohweg и соавт. 2009).

Гомолог вирусного онкогена v-Ki-ras 2 саркомы крыс Кирстена (KRAS)

KRAS является членом надсемейства малых ГТФаз и протоонкогеном, задействованным на ранних этапах многих путей передачи сигналов, таких как MAPK- и AKT-опосредованные пути, являющихся потенциально онкогенными. Одиночные замены аминокислот ведут к активации мутаций, результатом чего становится трансформированный белок, который играет ключевую роль в различных злокачественных образованиях, включая рак желудка (Capella и соавт., 1991). Онкогенные мутации KRAS редко встречаются при раке желудка. В одной разновидности рака желудка локус KRAS был амплифицирован, что приводило к гиперэкспрессии белка KRAS. Таким образом, амплификация гена, скорее всего, представляет собой молекулярную основу для избыточной активации KRAS при раке желудка (Mita и соавт., 2009). Аллели мутировавшего белка KRAS вносят свой вклад в индукцию VEGF, стимулируемую гипоксией (Kikuchi и соавт., 2009; Zeng и соавт., 2010). Мутировавший KRAS может быть также обнаружен в сыворотке или плазме пациентов, больных раком, и был, таким образом, предложен для использования в качестве легко доступного опухолевого маркера (Sorenson, 2000). Пептид KRAS-001 образован только из одного из двух вариантов сплайсинга - NP_004976 (188 аминокислот), а не сплайс-варианта - NP_203524 (189 аминокислот). Эти варианты сплайсинга различаются по последнему экзону, на котором локализован KRAS-001.

Не-SMC субъединица G комплекса конденсина I (NCAPG)

NCAPG является частью комплекса конденсина I, который образован как белками семейства «сохранения структурной целостности хромосом» (SMC), так и не-SMC-белками. Он регулирует конденсацию и сегрегацию хромосом во время митоза (Seipold и соавт., 2009). Гиперэкспрессия NCAPG была обнаружена в многочисленных видах опухолей, включая носоглоточную карциному (Li и соавт., 2010), почечно-клеточную карциному (Satow и соавт., 2010) и меланому (Ryu и соавт., 2007). В нормальных тканях наиболее высокий уровень экспрессии NCAPG наблюдается в семеннике. Он был предложен в качестве возможного маркера пролиферации и потенциального прогностического индикатора при раке (Jager и соавт., 2000).

ДНК-топоизомераза II альфа (TOP2A) и ДНК-топоизомераза II бета (TOP2B)

TOP2A и TOP2B кодируют высоко гомологичные изоформы ДНК-топоизомеразы, которая контролирует и изменяет топологические состояния ДНК во время транскрипции, и принимает участие в конденсации хромосом, разделении хроматид, репликации и транскрипции. Топоизомераза является мишенью нескольких противораковых препаратов, таких как антрациклин, а многочисленные ее мутации были связаны с резистентностью к лекарственным препаратам (Kellner и соавт., 2002) (Jarvinen и Liu, 2006). TOP2A (не TOP2B) необходима для клеточной пролиферации. Она находится по соседству с онкогеном HER2 и амплифицирована в значительном большинстве видов HER2-положительных опухолей молочной железы, но и также в видах без HER2-положительного статуса (Jarvinen и Liu, 2003), и во многих других видах опухолей. Для одной разновидности рака желудка также было установлено, что TOP2A является амплифицированной и гиперэкспрессированной, зачастую одновременно с HER2 (Varis и соавт., 2002) (Liang и соавт., 2008).

Ламинин, гамма 2 (LAMC2)

Ламинины являются главными неколлагеновыми компонентами базальных мембран. Они задействованы в клеточной адгезии, дифференциации, миграции, сигнальных путях и метастазировании. Цепь гамма-2 вместе с цепями альфа-3 и бета-3 формируют ламинин-5. LAMC2 способствует инвазивному росту человеческих раковых клеток *in vivo*. Он высоко экспрессируется клетками человеческого рака на линии инвазии, и уровень экспрессии соотносится с плохим прогнозом (Tsubota и соавт., 2010). Образованный за счет MMP-2 продукт расщепления ламинина-5 способен к активации сигнального каскада EGFR и способствует клеточной подвижности (Schenk и соавт., 2003). При раке желудка LAMC2 может индуцироваться членами семейства EGFR или Wnt5a, и, как было показано, инвазивная активность зависит от LAMC2 (Tsubota и соавт., 2010) (Yamamoto и соавт., 2009).

Арил-углеводородный рецептор (AHR)

AHR связывается с планарными ароматическими атомами углеводорода, такими как ТХДД (2,3,7,8-тетрахлордibenzo-p-диоксин), и опосредует транскрипцию генов, включая ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, такие как ферменты цитохрома P450. Он также играет роль в прохождении клеточного цикла (Barhoover и соавт. 2010). Считается, что AhR отчасти связан с активностью диоксина, стиму-

лирующей развитие опухоли, поскольку ему присущи способствующие пролиферации и антиапоптозные функции, и он может привести к нарушению регуляции межклеточных контактов, дедифференциации и повышенной подвижности (Watabe и соавт. 2010) (Dietrich и Kaina 2010) (Marlowe и соавт. 2008). Экспрессия AHR может быть снижена за счет TGF-бета (Dohr и Abel 1997; Wolff и соавт. 2001) и вызвана сигнальными путями Wnt или бета-катенина (Cheshire и соавт. 2004). Гиперэкспрессия AHR была обнаружена во многих видах рака, включая рак желудка, где она соотносилась с частой экспрессией CYP1A1 (Ma и соавт. 2006). Экспрессия AHR и ядерная транслокация были выше в раковых опухолях желудка, чем в нормальных тканях, и экспрессия постепенно возрастала во время онкогенеза (Peng и соавт. 2009a). Активация сигнального пути AhR повышает инвазивный потенциал клеток рака желудка, скорее всего, за счет c-Jun-зависимой индукции MMP-9 (Peng и соавт. 2009b). В модели с мышами экспрессия конститутивно активного мутанта арил-гидроуглеводородного рецептора (CA-AhR) приводит к развитию опухолей желудка, соотносясь с повышенной смертностью (Andersson и соавт. 2002; Kuznetsov и соавт. 2005). Функция AhR при раке, по-видимому, носит неоднозначный характер, поскольку в некоторых исследованиях была также выявлена его активность по подавлению развития опухоли (Gluschkaider и соавт. 2010) (Fan и соавт. 2010).

Рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности (RHAMM) (HMMR)

HMMR может встречаться на клеточной поверхности, где он связывается с гиалуроновой кислотой (HA) и взаимодействует с HA-рецептором CD44. Данное взаимодействие играет роль в таких процессах, как клеточная подвижность, заживление ран и инвазия (Gares и Pilarski, 2000). Внутриклеточно HMMR связан с цитоскелетом, микротрубочками, центросомами и митотическим веретеном и играет роль в контроле целостности митотического веретена. HMMR экспрессируется в избытке несколькими видами раковых тканей (Sohr и Engeland, 2008). Предполагалось, что HA защищает раковые клетки от иммунной атаки. Уровень HA в сыворотке часто повышен у пациентов, имеющих метастазы (Delpech и соавт., 1997). HMMR был идентифицирован в качестве многообещающего опухолеассоциированного антигена и возможного прогностического индикатора при AML и ХЛЛ. Пептиды, полученные из HMMR, использовали в вакцинах против лейкемии. HMMR-001 в равной степени прошел испытания *in vitro* на иммуногенность, но не использовался для вакцинации (Tzankov и соавт., 2011) (Greiner и соавт., 2010; Schmitt и соавт., 2008; Tabarkiewicz и Giannopoulos, 2010) (Greiner и соавт., 2005). Гиперэкспрессия HMMR была также выявлена в нескольких других видах рака и зачастую это было связано с плохим прогнозом. HMMR экспрессировался также в избытке при раке желудка, часто в комбинации с CD44, и было сделано предположение, что он способствует инвазии и развитию метастазов (Li и соавт., 1999) (Li и соавт., 2000a) (Li и соавт., 2000b).

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

TPRX2 - это белок, связанный с пролиферацией, экспрессируемый на фазах S-, G(2)- и M клеточного цикла, который считается маркером пролиферации (Cordes и соавт., 2010).

Он необходим для нормальной нуклеации микротрубочек, например, для образования митотического веретена. TPX2 соединяется с геном *Aurora A* и активирует его (Bird и Human, 2008; Moss и соавт., 2009). Фосфорилирование TPX2 с Polo-подобной киназой 1 усиливает его способность активировать *Aurora A* (Eckerdt и соавт., 2009). TPX2 экспрессируется в избытке клетками многих видов опухолей и зачастую экспрессируется в избытке в комбинации с геном *Aurora-A* (Asteriti и соавт., 2010). Примерами, в которых была выявлена чрезмерная экспрессия TPX2 (зачастую связанная с плохим прогнозом или более поздней стадией) являются менингиома (Stuart и соавт., 2010), рак легких (Kadara и соавт., 2009) (Lin и соавт., 2006; Ma и соавт., 2006) (Manda и соавт., 1999) и почечно-клеточная карцинома (Shigeishi и соавт., 2009b) (Satow и соавт., 2010) (Wang и соавт., 2003).

Настоящее изобретение, поэтому, относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбирается из группы SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95 или их вариант, который по меньшей мере на 80% гомологичен SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95, или их варианту, который 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 выбирается из группы SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95 или их вариант, который по меньшей мере на 80% гомологичен SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30 и наиболее предпочтительно от 8 до 14 аминокислот.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам, описанным ранее, имеющим способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (MHC) I или II класса.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам, описанным ранее, где пептид состоит или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам, описанным ранее, где пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам, описанным ранее, где пептид является слитым белком, в частности, включающим N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвари-

антной цепи (Ii) HLA-DR.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей описанные ранее пептиды, при условии, что пептид не является полностью человеческим белком.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, описанной ранее, которая является ДНК, кДНК, ПНК, ЦНК, РНК или их комбинациями.

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному экспрессировать описанную ранее нуклеиновую кислоту.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, описанному ранее, к нуклеиновой кислоте, описанной ранее, или к вектору экспрессии, описанному ранее, для применения в медицине.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину, включающей нуклеиновую кислоту, описанную ранее, или вектор экспрессии, описанный ранее.

Настоящее изобретение далее относится к описанной клетке-хозяину, которая является антиген-презентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к описанной клетке-хозяину, где антиген-презентирующая клетка является дендритной клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения описанного пептида, 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 описанным пептидом.

Настоящее изобретение далее относится к описанному способу, 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 описанному способу, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 33 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к активированным цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ), полученным описанным способом, 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 описанную аминокислотную последовательность, причем способ включает введение пациенту эффективного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в соответствии с определением.

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

Настоящее изобретение далее относится к описанному способу применения, где лекарственное средство является вакциной.

Настоящее изобретение далее относится к описанному способу применения, где лекарственное средство обладает активным противораковым действием.

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

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

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

Предложенные в контексте данного изобретения белки, кодируемые генами ABL1, ADAM10, AHR, CCND2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EIF2S3, LOC255308, ERHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP12, MMP3, MST1R, NUF2, OLFM4, PROM1, RRM2, THY1, TMPRSS4, TOP2A, TSPAN1, WNT5A, HIF1A и PTK2, как было описано в литературе, экспрессируются в избытке клетками рака желудка по сравнению с нормальными тканями желудка или другими жизненно важными тканями (к примеру, печени, почек, сердца).

Было показано, что белки, кодируемые генами ABL1, ADAM10, ADAM8, AHR, ASPM, ATAD2, CCDC88A, CCNB1, CCND2, CCNE2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, CLCN3, COL6A3, ERHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HIF1A, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, IQGAP3, ITGB4, KIF11, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP3, MST1R, MUC6, NCAPG, NFYB, NUF2, OLFM4, PBK, PLK4, PPAP2C, PROM1, PTK2, RRM2, SIAH2, THY1, TOP2A, TPX2, TSPAN1,

TSPAN8, UBE2S, UCHL5 и WNT5A, играют важную роль в онкогенезе, так как они задействованы в злокачественной трансформации, клеточном росте, пролиферации, ангиогенезе или инвазии нормальной ткани. Также существуют некоторые доказательства активности, связанной с заболеванием раком, у белков, кодируемых генами DNAJC10, EIF2S3, EIF3L, POLD3, PSMC2, PSMD14 и Tmprss4.

Было показано, что белки, кодируемые генами PROM1, WNT5A, SMC4, PPAP2C, GPR38, OLFM4 и THY1 экспрессируются в избытке и/или являются функционально важными в стволовых клетках и/или раковых стволовых клетках. PROM1 был предложен в качестве маркера стволовых клеток рака желудка, хотя данные противоречивы. Раковые стволовые клетки являются субпопуляцией опухолевых клеток с потенциалом самообновления, что необходимо для постоянного роста опухоли. Эти клетки находятся в специализированных и высоко организованных структурах, так называемых нишах раковых стволовых клеток, которые требуются для сохранения потенциала самообновления раковых стволовых клеток.

Было показано, что гиперэкспрессия белков AHR, ASPM, ATAD2, CCNB1, CCND2, CCNE2, CDK1 (CDC2), CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, COL6A3, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HIF1A, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF11, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, LMNB1, MET, MMP11, MMP3, MST1R, MUC6, NCAPG, NUF2, OLFM4, PBK, PPAP2C, PROM1, PTK2, Tmprss4, TPX2, TSPAN1 и WNT5A в опухолях связана с поздними стадиями заболевания и плохим прогнозом для пациентов.

Поэтому в настоящем изобретении предложены способы идентификации животного, предпочтительно человека, который, скорее всего, болен раком желудка. В одном варианте осуществления установленная вероятность находится между 80 и 100%. Один таковой способ включает определение уровня по меньшей мере одного из белков MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 в опухолевом образце животного субъекта. В одном варианте осуществления образец изымается методом радикальной хирургии. В другом варианте осуществления образец изымается методом игольной биопсии.

Если уровень MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6, как установлено, в клетках выше на 20% или более относительно уровня, установленного в доброкачественных эпителиальных клетках того же самого образца, то у животного субъекта, скорее всего, имеется рак желудка.

Чем выше уровень различных белков группы, включающей MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6, тем выше вероятность того, что будет установлено, что у животного субъекта имеется рак желудка.

В одном варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится *in situ*. В другом варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится *in vitro*. В другом отличном варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится *in vivo*. В предпочтительном варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится методом лазерной захватывающей микроскопии вместе с анализом Western blot.

В одном конкретном варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится с помощью антитела, специфического для MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6. В другом таком варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится с помощью ПЦР с праймером, специфическим для мРНК, кодирующей MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6. В еще одном варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится с помощью нуклеотидного зонда, специфического для мРНК, кодирующей MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6. В другом варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится с помощью анализа Northern blot. В другом варианте осуществления определение уровня MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 производится методом анализа с помощью защиты от рибонуклеазы. В других вариантах осуществления для выявления полипептидов MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 в жидкой пробе организма (такой как кровь, сыворотка, мокрота, моча или перитонеальная жидкость) могут быть использованы такие иммунологические методы, как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и иммунный блоттинг (Western blot). Биоптаты, тканевые и клеточные образцы (такие как из яичника, лимфатических узлов, соскобы эпителиальных клеток с поверхности яичника, биоптаты легких, биоптаты печени и любые жидкостные пробы, содержащие клетки (такие как перитонеальная жидкость, мокрота и плевральный секрет), могут быть проанализированы посредством дезагрегации и/или растворения ткани или клеточного образца и проведения иммуноанализа на присутствие полипептида, такого как ELISA, RIA или иммунного блоттинга (Western blotting). Такие клеточные или тканевые образцы могут быть также проанализированы методами на основе нуклеиновых кислот, к примеру, полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с амплификацией, гибридизации Нозерн-блоттинг или слот- или дот-блоттинг. Для визуализации распределения опухолевых клеток в образцах тканей для выявления полипептидных маркеров рака желудка или мРНК соответственно,

могут быть применены диагностические тесты, которые сохраняют структуру ткани, например, иммуногистологическое окрашивание, *in situ* гибридизация РНК или *in situ* ОТ-ПЦР. Для локализации опухолевой массы *in vivo* могут применяться методы визуализации, такие как магнитно-резонансная томография (МРТ) посредством введения в субъект антитела, которое специфически связывается с полипептидами MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 (в особенности полипептидом, находящимся на клеточной поверхности), где антитело конъюгировано или по-другому связано с парамагнитным индикатором (или другой подходящей выявляемой единицей в зависимости от используемого метода визуализации); альтернативно локализацию не меченого опухолевого маркер-специфического антитела можно определить с помощью вторичного антитела, связанного с выявляемой единицей.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены химерные/слитые белки/пептиды, включающие полипептиды MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 и их фрагменты, включая функциональные, протеолитические и антигенные фрагменты.

Партнер по слиянию или сегменты гибридной молекулы адекватно обеспечивают эпитопы, которые стимулируют CD4⁺ Т-клетки. Стимулирующие эпитопы CD4⁺ хорошо известны из уровня техники и включают те, что были идентифицированы в столбнячном токсине. В еще одном предпочтительном варианте осуществления пептид является слитым белком, в частности включающим N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR. В одном варианте осуществления пептид по изобретению является усеченным белком человека или слитым белком белкового фрагмента и другого полипептидного участка при условии, что человеческий участок включает одну или более аминокислотную последовательность по изобретению.

Антитела к полипептидам MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6, к химерным/слитым белкам, включающим полипептиды MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6, в равной степени как и фрагменты полипептидов MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6, включая протеолитические и антигенные фрагменты, и к химерным/слитым белкам/пептидам, включая эти фрагменты, являются также предметом настоящего изобретения. Более того, способы использования таких антител для прогнозирования заболевания раком и рака желудка, в частности, также являются предметом настоящего изобретения.

Антитела по настоящему изобретению могут быть поликлональными антителами, моноклинальными антителами и/или химерными антителами. Бессмертные линии клеток, которые вырабатывают моноклональное антитело по настоящему изобретению, являются также частью настоящего изобретения.

Среднему специалисту данной области будет понятно, что в некоторых частных случаях более высокая экспрессия MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 в качестве опухолевого гена-маркера будет указывать на худший прогноз для субъекта, имеющего рак желудка. Например, относительно более высокие уровни экспрессии MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 могут указывать на относительно крупную первичную опухоль, более высокую тяжесть заболевания (к примеру, больше метастазов) или относительно более злокачественный фенотип опухоли.

Чем больше различных белков группы, включающей MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6, экспрессированы в избытке, тем хуже прогноз.

Диагностические и прогностические способы по изобретению охватывают использование известных способов, к примеру, основанных на антителах способов выявления полипептидов MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6, а также способов, основанных на гибридизации и/или амплификации нуклеиновых кислот для выявления мРНК MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6.

Кроме того, в связи с тем, что быстрое уничтожение опухолевых клеток часто приводит к образованию аутоантител, опухолевые маркеры рака желудка по изобретению могут использоваться в серологических анализах (например, в тесте ELISA для сыворотки субъекта) для обнаружения аутоантител против MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 у субъекта. Уровни полипептид-специфического аутоантитела для MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6, которые по меньшей мере приблизительно в 3 раза выше (и предпочтительно по меньшей мере в 5 раз или 7 раз выше, наиболее предпочтительно по меньшей мере в 10 или 20 раз выше), чем в контрольном образце, являются признаком рака желудка.

Находящиеся на поверхности клетки, внутриклеточные и секретируемые полипептиды MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 могут быть также все использованы в анализе биоптатов, например, ткани или клеточных образцов (включая клетки, полученные из жидкостных образцов, таких как перитонеальная жидкость), для определения, содержит ли тканевый или клеточный биоптат клетки рака желудка. Биоптат может быть проанализирован как интактная ткань или образец цельной клетки, или же ткань или клеточный образец могут быть дисагрегированы и/или растворены, как это необходимо для конкретного вида используемого диагностического анализа. Например, биоптаты или образцы могут подвергаться цельнотканевому или цельноклеточному анализу для определения уровня полипептида или мРНК MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 *in situ*, например, используя иммуногистохимический метод, гибридизацию мРНК *in situ* или ОТ-ПЦР *in situ*.

Опытному специалисту известно, как приготавливать ткани или клетки к анализу для определения уровня полипептида или мРНК с использованием иммуногистохимических методов, таких как ELISA, иммунный блоттинг или равноценные методы, или же методов анализа уровня мРНК посредством аналитических методов, основанных на нуклеиновых кислотах, таких как ОТ-ПЦР, нозерн-гибридизация или слот- или дот-блоттинг.

Диагностические наборы для измерения уровней экспрессии MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6.

В настоящем изобретении предложено оборудование для обнаружения повышенного уровня экспрессии MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 в качестве гена-маркера рака желудка у субъекта. Набор для выявления полипептидного маркера рака желудка предпочтительно содержит антитело, которое специфически связывается с выбранным полипептидным маркером рака желудка. Набор для выявления мРНК-маркера рака желудка предпочтительно содержит одну или более нуклеиновых кислот (к примеру, один или более олигонуклеотидный праймер или зонд, зонды ДНК, зонды РНК или матрицы для синтеза зондов РНК), которые специфически гибридизируются с мРНК MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6.

В частности, набор на основе антител может использоваться для выявления присутствия и/или определения уровня полипептида MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6, который специфически связан с антителом или его иммунореактивным фрагментом. Набор может включать антитело, активное по отношению к антигену, и реагент для выявления продукта реакции антитела с антигеном. Такой набор может быть комплектом ELISA и может содержать контроль (например, специфицированное количество конкретного полипептидного маркера рака желудка), первичные и вторичные антитела, когда это целесообразно, и любые другие необходимые реагенты, такие как выявляемые элементы, субстраты ферментов и цветные реагенты, как описывалось выше. Диагностический набор альтернативно может быть набором для иммуноблоттинга, как правило включающим компоненты и реагенты, описываемые в настоящем изобретении.

Набор на основе нуклеиновой кислоты может использоваться для выявления и/или определения уровня экспрессии MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 посредством выявления и/или определения количества мРНК MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 в образце, таком как тканевый или клеточный биоптат. Например, набор для проведения ОТ-ПЦР для выявления повышенной экспрессии MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 предпочтительно содержит олигонуклеотидные праймеры, которых достаточно для проведения обратной транскрипции мРНК-маркера рака желудка до кДНК и амплификацию кДНК-маркера рака желудка посредством ПЦР, и будет также предпочтительно содержать матричные молекулы и праймеры для проведения соответствующих контрольных ПЦР-реакций, а также внутреннего контроля для количественного определения. Средний специалист данной области в состоянии отобрать подходящие праймеры для проведения реакций обратной транскрипции и ПЦР, а также соответствующие контрольные реакции, которые необходимо провести. Такое руководство приводится, например, в работе F. Ausubel и соавт., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1997. Многочисленные разновидности ОТ-ПЦР известны из уровня техники. Целенаправленная доставка иммунотоксинов в MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 как до терапевтических мишеней может осуществляться как метод лечения или профилактики рака желудка. Например, молекула антитела, которая специфически связывается с находящимся на поверхности клетки полипептидом MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6, может быть конъюгирована с радиоизотопом или другим токсическим соединением. Конъюгаты антител вводят в субъект, так что связывание антитела с родственным ему полипептидом рака желудка приводит к нацеленной доставке терапевтического соединения в клетки рака желудка, тем самым производя лечение рака яичника.

Терапевтическим элементом может быть токсин, радиоизотоп, лекарственное, химическое средство или белок (см., например, Berg и соавт. "Pharmacokinetics and antitumor activity of a bivalent disulfide-stabilized Fv immunotoxin with improved antigen binding to erbB2" *Cancer Res.* 59: 4018-4022 (1999)). Например, антитело может быть связано или конъюгировано с бактериальным токсином (например, токсин дифтерии, экзотоксин псевдомонас А, холерный токсин) или растительным токсином (например, рициновый токсин) для нацеленной доставки токсина к клетке, экспрессирующей MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6. Этот иммунотоксин может быть доставлен в клетку, и при соединении с находящимся на поверхности клетки полипептидным маркером рака желудка токсин, конъюгированный с антителом, специфическим для маркера рака желудка, будет доставлен в клетку.

Кроме того, для любого полипептида MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6, для которого существует специфический лиганд (например, лиганд, который связывается с находящимся на поверхности клетки белком), может быть использован лиганд вместо антитела для нацеливания токсичного соединения на клетки рака желудка, как описывалось выше.

Понятие "антитело" используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным молекулам иммуноглобулина в понятие "антитела" включены также фрагменты или полимеры таких молекул иммуноглобу-

лина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют одно из желаемых свойств (например, специфически связываются с полипептидным маркером рака желудка, доставляют токсин к клетке рака желудка, экспрессирующей раковый ген-маркер рака желудка на повышенном уровне и/или ингибируют активность ракового полипептида-маркера), описанных в настоящем изобретении.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных методов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры рака желудка 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 полипептид MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 или его фрагмент, может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, клетки дрожжей, насекомых или млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован для получения препарата из моноклонального или поликлонального антитела, которое специфически связывается с полипептидным маркером рака желудка, использованным для получения антитела.

Специалисту данной области будет известно, 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, ELISA, иммуногистохимия, визуализация *in vivo*, терапия на основе иммунотоксина). Антитела испытаны на желаемую для них активность с помощью известных методов в соответствии с целью применения антител (например, ELISA, иммуногистохимия, иммунотерапия и т.д.; для получения дальнейшей информации по генерированию и испытанию антител см., например, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988). А *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988). Например, антитела могут быть испытаны с помощью анализов ELISA, метода иммунного блоттинга (Western-blot), иммуногистохимического окрашивания законсервированных формальдегидом образцов рака желудка или замороженных тканевых срезов. После их первоначальной характеристики *in vitro* антитела, предназначенные для терапевтического или диагностического применения *in vivo* испытывают 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 специфически включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен с соответствующими последовательностями 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) с соответствующими последовательностями 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 4816567).

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены при использовании гибридомного метода. В рамках гибридомного метода мышь или другое подходящее животное-хозяин 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 методов с рекомбинантной ДНК, таких как описываемые в патенте США 4816567. 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 мышиных 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 техник, 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 4342566. 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 Fe-фрагмент. В результате воздействия пепсина получается фрагмент, который имеет два антиген-комбинирующих сайта и все еще способен к поперечной сшивке антигена.

Фрагменты антитела, как связанные с другими последовательностями так и не связанные, могут также включать инсерции, делеции, замены или другие выбранные 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 биоактивности, таким как активностью связывания, регуляцией связывания на связывающем домене и т.д. Функциональные или активные участки антитела могут быть идентифицированы при мутагенезе специфического 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 нечеловеческих видов (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 нечеловеческими остатками. 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 аминокислотных остатков, введенный в него из источника, являющегося нечеловеческим. Такие нечеловеческие аминокислотные остатки называются 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 4816567), где по существу менее чем один интактный человеческий переменный домен был заменен соответствующей последовательностью нечеловеческого вида. 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 участка присоединения тяжелой цепи антитела у химерных и мутантных мышей зародышевой линии приводит к полному ингибированию выработки эндогенных антител. Перенос генной матрицы 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 усиления изотонности состава. 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 изделий, 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 в субъект, пациенту или клетку посредством инъекции (например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутримышечно) или другими способами, такими как вливание, которое гарантирует доставку к кровотоку эффективным образом. Антитела также могут вводиться внутриморальными или перитуморальными способами, чтобы вызвать локальные, а также и системные терапевтические эффекты. Предпочтительными являются локальная или внутривенная инъекция.

Эффективная дозировка и график введения антител могут быть определены эмпирически, а приня-

тие 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 медикаментов. Типичная дневная дозировка антитела, используемого отдельно, может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг по весу тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела для лечения рака желудка эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака желудка у 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 раковых заболеваний.

Так как белки ABL1, ADAM10, AHR, CCND2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EIF2S3, LOC255308, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAR HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP12, MMP3, MST1R, NUF2, OLFM4, PROM1, RRM2, THY1, TMPRSS4, TOP2A, TSPAN1, WNT5A, HIF1A и PTK2, как было показано, высоко экспрессированы, по меньшей мере, в подвиде тканей рака желудка в сравнении с нормальными тканями, ингибирование их экспрессии может быть интегрировано в любую терапевтическую стратегию для лечения или профилактики рака желудка.

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 видами. Образование такого гибридного дуплекса нуклеиновых кислот интерферирует с транскрипцией геномной ДНК-мишени, кодирующей антиген, или процессингом/транспортом/трансляцией и/или стабильностью антигенной мРНК-мишени опухоли.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты могут быть доставлены с использованием различных подходов. Например, антисмысловые олигонуклеотиды или антисмысловая РНК могут вводиться непосредственно (например, внутривенной инъекцией) в субъект 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 различна. 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 опухолевого маркера рака желудка с помощью генной терапии с применением антисмысловых конструкций может быть выполнено посредством прямого введения антисмыслового РНК-маркера рака желудка в субъект. Антисмысловый опухолевый РНК-маркер может быть получен и выделен с помощью любого стандартного метода, но наиболее просто его получить с помощью транскрипции *in vitro* с использованием антисмыслового опухолевого кДНК-маркера под контролем высоко эффективного промотора (например, T7-промотора). Введение антисмыслового опухолевого РНК-маркера в клетки может быть произведено любым способом для прямого введения нуклеиновых кислот, описываемых ниже.

Альтернативная стратегия ингибирования функции MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 при использовании генной терапии включает внутриклеточную экспрессию антител к MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 или участка антител к MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6. Например, ген (или фрагмент гена), кодирующий моноклональное антитело, которое специфически связывается с полипептидом MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 и ингибирует его биологическую активность, помещают под транскрипционным контролем специфической (например, ткане- или опухоль-специфической) регуляторной последовательности генов внутрь вектора экспрессии нуклеиновой кислоты. Вектор вводится затем в субъект, так чтобы он поглощался клетками рака желудка или другими клетками, которые затем секретируют антитела к MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6 и, тем самым, блокируют биологическую активность полипептида MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6. Предпочтительно, если полипептиды MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 присутствуют на внеклеточной поверхности клеток рака желудка.

В способах, описываемых выше, которые включают введение и поглощение экзогенной ДНК в клетках 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 желудочной опухоли. Вектор может представлять собой имеющийся в продаже препарат, такой как аденовирусный вектор (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, 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., Gaithersburg, Md.), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Хильден, Германия) и TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis.), 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 для которой имеется в наличии в компании "Genetronics, Inc." (San Diego, штат Калифорния, США), в равной степени как и с помощью устройства "SONOPORATION machine" (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, штат Аризона, США).

Одним из примеров является доставка вектора посредством вирусной системы, такой как ретровирусная векторная система, которая способна упаковывать рекомбинантный ретровирусный геном. Рекомбинантный ретровирус может быть затем использован для инфицирования и, таким образом, доставки в инфицированные клетки антисмысловой нуклеиновой кислоты, которая ингибирует экспрессию MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB или MUC6. 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, псевдотипичных ретровирусных векторов. Также может применяться методики физической трансдукции, такие как липосомная доставка и рецептор-опосредованные и другие эндоцитозные механизмы. 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 , $^{99\text{Tc}}$, ^{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 MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 при показателе аффинности (Kd) ниже чем 1×10 мкМ.

Антитела для диагностического применения могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, свет, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопии; флюороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, 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 комплексобразующего 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 законсервирован таким консервантом, как формалин. Законсервированный или заделанный срез содержит образец, контактировавший с помеченным первичным антителом и вторичным антителом, где антитело используется для выявления экспрессии белков MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB и MUC6 *in situ*.

В настоящем изобретении предложен, таким образом, пептид, включающий последовательность, которая выбирается из группы из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95 или их вариант, который по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90% и более предпочтительно на 96% гомологичен SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95, или их вариант, который будет индуцировать Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом.

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

В контексте настоящего изобретения понятие "гомологичный" относится к степени идентичности между последовательностями двух аминокислотных последовательностей, т.е. пептидных или полипептидных последовательностей. Упомянувшееся ранее понятие "гомология" определяется при сравнении двух последовательностей, выравниваемых в оптимальных условиях со сравниваемыми последовательностями. Сравнимые последовательности в контексте данного изобретения могут иметь инсерцию или делецию (например, разрыв и т.п.) в оптимальном выравнивании двух последовательностей. Такая гомология последовательности может быть подсчитана с помощью создания выравнивания, например, по алгоритму ClustalW. Широко распространено программное обеспечение для анализа последовательностей, в частности, Vector NTI, GENETYX или аналитические инструменты, предоставляемые общественными банками данных.

Специалист данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вариантом специфического пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Fong и соавт., 8809-14); (Zaremba и соавт., 1805-14; Colombetti и соавт., 2730-38; Array и соавт., 4570-77).

"Вариантом" данной аминокислотной последовательности авторы изобретения обозначают, 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 33. 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 и соавт., 1997) и банков данных (Rammensee и соавт., 213-19) конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими ключевую 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, представленные в SEQ ID NO: 1 по 95, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохраняют ли такие варианты способность связываться с молекулами МНС I или II класса. 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 обязательно вносят 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 обозначение которого авторы изобретения включают олигопептиды или полипептиды), который включает аминокислотные последовательности или их участок или их вариант, как дано.

Таблица 3. Варианты и участок пептидов в соответствии с SEQ ID NO: 1 по 33

		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	Код пептида		L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
SEQ ID 1	Варианты			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	Код пептида		S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
SEQ ID 2	Варианты			F								
												L
												F
				F								L
				F								F
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UCL5-001	Код пептида		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
SEQ ID 3	Варианты			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	Код пептида		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
SEQ ID 4	Варианты			F								
												L
												I
				F								F
				F								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PROM-001	Код пептида		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
SEQ ID 5	Варианты			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	Код пептида		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F
SEQ ID 6	Варианты			Y								
				F								
												L
												I

				Y									L
				Y									I
				F									L
				F									I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
MST1R-001	Код пептида		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F		
SEQ ID 7	Варианты			F									
													L
													I
				F									L
				F									I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
NFYB-001	Код пептида		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I		
SEQ ID 8	Варианты			F									
													L
													F
				F									L
				F									F
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SMC4-001	Код пептида		H	Y	K	P	T	P	L	Y	F		
SEQ ID 9	Варианты			F									
													L
													I
				F									L
				F									I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
UQCRB-001	Код пептида		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L	
SEQ ID 10	Варианты			F									
													F
													I
				F									F
				F									I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
PPAP2C-001	Код пептида		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L		
SEQ ID 11	Варианты			F									
													F
													I
				F									F

				F								I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
AVL9-001	Код пептида		F	Y	I	S	P	V	N	K	L		
SEQ ID 12	Варианты			F									
												F	
												I	
				F								F	
				F								I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
NUF2-001	Код пептида		V	Y	G	I	R	L	E	H	F		
SEQ ID 13	Варианты			F									
												L	
												I	
				F								L	
				F								I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
ABL1-001	Код пептида		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L		
SEQ ID 14	Варианты			F									
												F	
												I	
				F								F	
				F								I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
MUC-006	Код пептида		N	Y	E	E	T	F	P	H	I		
SEQ ID 15	Варианты			F									
												F	
												L	
				F								F	
				F								L	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
ASPM-001	Код пептида		R	Y	L	W	A	T	V	T	I		
SEQ ID 16	Варианты			F									
												F	
												L	
				F								F	
				F								L	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
EPHA2-005	Код пептида		V	Y	F	S	K	S	E	Q	L		

				F							F	
				F							I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL6A3-001	Код пептида		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
SEQ ID 23	Варианты			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	Код пептида		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
SEQ ID 24	Варианты			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	Код пептида		Y	Y	K	N	I	G	L	G	F	
SEQ ID 25	Варианты			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-001	Код пептида		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
SEQ ID 26	Варианты			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	Код пептида		L	Y	P	E	V	F	E	K	F	
SEQ ID 27	Варианты			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

HSP90B1-001	Код пептида		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F
SEQ ID 28	Варианты			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SIAH2-001	Код пептида		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F
SEQ ID 29	Варианты			Y								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SLC6A6-001	Код пептида		V	Y	P	N	W	A	I	G	L	
SEQ ID 30	Варианты			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IQGAP3-001	Код пептида		V	Y	K	V	V	G	N	L	L	
SEQ ID 31	Варианты			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ERBB3-001	Код пептида		V	Y	I	E	K	N	D	K	L	
SEQ ID 32	Варианты			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KIF2C-001	Код пептида		I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L
SEQ ID 33	Варианты			F								
												F
												I
				F								F
				F								I

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, по существу, не влияли на протеолитическое расщепление, необходимое для выявления истинного эпитопа во время процессинга.

Соответственно в настоящем изобретении предложены также пептиды и варианты эпитопов МНС класса I, в которых указанный пептид или вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30, и, наиболее предпочтительно, от 8 до 14, а именно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 аминокислот.

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95.

"Состоящий по существу из" подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо последовательности в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95 или одним из их

вариантов, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или C-конце фрагменты аминокислот, которые не являются по существу формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для эпитопа 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.

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 для 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-инвертированные пептидомиметики могут быть получены методами, известными из уровня техники, например, такими, как описано в работе Meziere и соавторов (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237, включенной сюда путем ссылки. Этот принцип охватывает получение псевдопептидов, содержащих изменения, которые охватывают остов, но не ориентацию боковых цепей. Meziere и соавторы (1997) показывают, что эти псевдопептиды пригодны для связывания с МНС и ответов Т-хелперных клеток. Ретроинвертированные пептиды, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, намного более устойчивы к протеолизу.

Непептидной связью, являются, например, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}=\text{CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-}$, и $-\text{CH}_2\text{SO-}$. В патенте США 4897445 предложен способ твердофазного синтеза непептидных связей ($-\text{CH}_2\text{-NH}$) в полипептидных цепях, которые включают полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции альдегида и аминокислоты в присутствии NaCNBH_3 .

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, дансильные или трет-бутилоксикарбонильные группы, могут быть добавлены к аминоконцам пептидов. Подобным образом, ацетильная группа или 9-фторенилметоксикарбонильная группа может быть введена в аминные концы 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 более 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 путем ссылки. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксильного лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидную модификацию карбоксильных групп и сульфгидрильную модификацию с помощью окисления надмуравьиной кислотой цистеина до цистеиновой кислоты, образование ртутных производных, образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями, реакцию с малеимидом, карбоксиметилирование йодоуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирование 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, остатков аргинила 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 специфическим веществам.

Также распространена селективная редукция 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'-этилкарбодиимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты.

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

Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке (кросс-линкинг) белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения поли(этилен)гликоля 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 остатков тирозила. Поперечная сшивка через образование дитирозина может быть произведена с ионами перекиси водорода/меди.

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

Успешная модификация терапевтических белков и пептидов с PEG (полиэтиленгликолем) часто связана с увеличением полупериода циркуляции при поперечной сшивке белков с 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 пептидного синтеза, как раскрыто у Lu и соавторов (1981), и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится группой 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc). Повторное расщепление этой высоко щелочелабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональности боковой цепи могут быть защищены как их бутиловые эфиры (в случае серинтреонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбониловое производное (в случае лизина и гистидина), тритиловое производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил (в случае аргинина). Где глутамин или аспаргин являются C-терминальными остатками, для защиты функциональности боковой амидо-цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламида, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (остов-мономер), бисакрилоилэтилендиамин (кросс-линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Использованным агентом с расщепляемым соединением пептид-смола является кислотнотлабильное производное 4-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются как их преформированные симметричные ангидридные производные за исключением аспарагина и глутамина, которые добавляются с применением метода обратного соединения, опосредованного N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксибензотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или технологии контроля изотином. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50% поглотителя примесей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов для синтеза пептидов (см., например, Bruckdorfer, Mardel и Albericio 29-43 и соавт. 29-43 и прилагаемые ссылки).

Трифторуксусную кислоту удаляют выпариванием в вакууме с последующим измельчением с диэтиловым эфиром для получения сырого пептида. Любые представленные поглотители удаляются простой технологией 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, Ноттингхэм, NG7 2QJ, Великобритания.

Очистка может быть произведена любой методикой или комбинацией таких методик как рекристаллизация, эксклюзионная (по размеру) 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, ЦНК, РНК или их комбинациями, как одно-, так и/или двухнитевыми; природными или стабилизированными формами полинуклеотидов, таких 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 для связывания полинуклеотидов, в особенности ДНК, с векторами, например, с помощью дополнительных липких концов. К примеру, в сегмент ДНК могут быть добавлены дополнительные гомополимерные участки для внесения в вектор ДНК. Вектор и сегмент ДНК в таком случае соединены водородной связью между дополнительными гомополимерными концевыми участками, образуя рекомбинантные молекулы ДНК.

Синтетические линкеры, содержащие один или несколько сайтов рестрикции, обеспечивают альтернативный способ присоединения сегмента ДНК к векторам. Синтетические линкеры, содержащие ряд сайтов рестрикционной эндонуклеазы, имеются в продаже в различных источниках, включая International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, США.

Желаемый способ модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, - это использование цепной реакции полимеразы, как раскрыто в работе (Saiki и соавт. (487-91)). 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 векторы, то предпочтительными являются осепные или аденовирусные векторы.

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящего хозяина 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 техниками, модифицированная соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для создания вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению. Такие техники включают те, что раскрыты в патентах США 4440859, 4530901, 4582800, 4677063, 4678751, 4704362, 4710463, 4757006, 4766075 и 4810648

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, желательна ли поддержка в эписомальной или интеграционной форме.

Как правило, ДНК вводится в вектор экспрессии, такой как плазида, с соответствующей ориентацией и правильной рамкой считывания 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 выбрать трансформированные клетки-хозяева. Одна из техник 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 котрансформации 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 CHO, имеющимися в наличии в ATCC Cell Biology Collection.

Типичная клеточная векторная плазида млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомицин. Одним примером является рSVL, имеющийся в наличии в Pharmacia, Piscataway, NJ, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является рMSG, имеющийся также в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются рRS403-406 и рRS413-

416, и они, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (YIps) и включают дрожжевые селективируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми центромерными плазмидами (Ycps). Основанные на промоторе CMV векторы (например, из Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазмическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, c-мус или MAT. Данные слитые белки позволяют выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

Сильный промоторный регуляторный участок цитомегаловируса человека (CMV) стимулирует конститутивные уровни белковой экспрессии, 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 подверженных репликации SV40 клетках COS. Векторы CMV, например, могут содержать точку начала для репликации pMB1 (производное pBR322) в бактериальных клетках, ген б-лактамазы для отбора устойчивости к ампициллину у бактерий, hGH polyA и точку начала fl. Векторы, содержащие лидерную последовательность препротрипсина (PPT), могут направлять секрецию слитых белков FLAG в культуральную среду для очистки с использованием антител ANTI-FLAG, смол и чашек. Другие векторы и системы экспрессии для применения с различными клетками-хозяевами хорошо известны из уровня техники.

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., Bethesda, MD, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типов культур ("American Type Culture Collection" (ATCC)), Rockville, MD, 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 печени 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 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 модели ДНК 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 соавторы (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 соавторов (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, другие клетки-хозяева могут быть пригодны в конкретных терапевтических методах. 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 MHC. 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. Для АПК, нагруженных

рекомбинантным слитым белком, содержащим простатическую кислую фосфатазу (PAP), сейчас проводятся исследования в целях лечения рака предстательной железы (Sipuleucel-T) (Small EJ и соавт. 67-74; Rini и соавт. 3089-94).

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 используются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внутривенной (i.v.) инъекции, подкожной (s.c.) инъекции, внутривенной (i.d.) инъекции, внутривенной (i.p.) инъекции, внутримышечной (i.m.) инъекции. Предпочтительные способы введения пептидной инъекции включают s.c., i.d., i.p., i.m. и i.v. Предпочтительные способы введения инъекции ДНК включают i.d., i.m., s.c., i.p. и i.v. Вводятся могут, к примеру, дозы объемом между 50 мкг и 1,5 мг, предпочтительно от 125 до 500 мкг пептида или ДНК и будут зависеть от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данных пределах успешно использовалась в предыдущих клинических исследованиях (Brunsvig и соавт. 1553-64; Staehler и соавт. 2007).

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 I или II класса человека, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей 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 недостаточная функция пептидного транспортера TAP. Подходящие клетки, в которых нет пептидного транспортера TAP, включают T2, RMA-S и клетки дрозофилы. 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 дрозофилы линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталоговым № CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается в работе Karle 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.

Аналогично, 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 SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 95 или их вариантную аминокислотную последовательность.

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), используются аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты при получении ЦТЛ. Plebanski и соавт. (1995) для получения ЦТЛ используют аутологичные лимфоциты периферической крови (ЛПК). Jochmus и соавт. (1997) описывают получение аутологичных ЦТЛ посредством загрузки 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 (аАПК), что является также подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. В данном исследовании, аАПК были получены при соединении преформированных комплексов МНС-пептид с поверхностью полистироловых частиц (микросферы) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на аАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоавидные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в пробах крови. Кроме комплексов МНС-пептид аАПК должны нести другие белки с костимуляторной активностью, такие как антитела к CD28, соединенные с их поверхностью. Кроме того, такая основанная на аАПК 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 способ для этого подробно описывается в патентной заявке WO 97/26328, включенном в контекст путем ссылки. Например, кроме клеток дрозофилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), бакуловирус-инфицированные клетки насе-

комых, 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 для 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 aberrантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по 95.

Предпочтительно, чтобы Т-клетка распознавала клетку при взаимодействии посредством ее ТКР с комплексом HLA/пептид (например, соединение). Т-клетки пригодны для способа уничтожения клеток-мишеней у пациента, клетки-мишени которого aberrантно 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. "Здоровым индивидом" авторы изобретения обозначают, что индивид имеет, в общем, хорошее здоровье, предпочтительно он имеет компетентную иммунную систему и более предпочтительно не страдает ни одним заболеванием, которые можно легко проконтролировать и выявить.

Клетками-мишенями для CD8-положительных Т-клеток *in vivo* в соответствии с настоящим изобретением могут быть клетки опухоли (которые иногда экспрессируют МНС класса I) и/или стромальные клетки, окружающие опухоль (опухольевые клетки) (которые иногда также экспрессируют МНС класса I (Dengjel и соавт., 4163-70)).

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" авторы изобретения понимают, что полипептид гиперэкспрессирован по сравнению с нормальными уровнями экспрессии, или что ген является "молчащим" в ткани, из которой образовалась опухоль, однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием "гиперэкспрессирован" авторы изобретения 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 т.н. adoptивного переноса Т-клеток хорошо известны из уровня техники и с ними можно ознакомиться, например, в работах (Rosenberg и соавт., 850-54; Rosenberg и соавт., 2346-57; Dudley и соавт., 889-97; Yee и соавт., 1676-80; Dudley и соавт., 16168-73); обобщенных в (Gattinoni и соавт., 383-93) и (Morgan и соавт., 2006).

Любая молекула по изобретению, т.е. пептид, нуклеиновая кислота, 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 *i.d.*, *i.m.*, *s.c.*, *i.p.* и *i.v.* 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. Пептид может быть также конъюгирован с подходящим носителем, таким как гемодианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. 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 Т-клетки CD4

или CD8. 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, представленную в SEQ ID NO: 1 по 33, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 15 и наиболее предпочтительно два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или тринадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть образован(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 (циклогексанилнуклеиновая кислота), РНК или их комбинаций. Методы конструирования и введения такой нуклеиновой кислоты хорошо известны из уровня техники. Обзор представлен, к примеру, в работе (Pascolo и соавт. 117-22). Полинуклеотидные вакцины просто получить, однако способ действия этих векторов по индуцированию иммунного ответа понят не полностью. Подходящие векторы и системы доставки включают вирусные ДНК и/или РНК, такие как системы, которые основаны на аденовирусе, вирусе коровьей оспы, 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 "генной пушки". Пептид или пептиды, закодированные нуклеиновой кислотой, могут быть слитым белком, например, с эпитопом, который стимулирует Т-клетки для соответствующего противоположного гипервариабельного участка (CDR), как описывается выше.

Лекарственное средство по изобретению может также включать один или более адьюванта. 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 по настоящему изобретению. Подходящие адьюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, Amplivax®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, СуаА, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганды FLT3, GM-CSF, 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, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторная система RepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [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 сапонина, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адьюванты, такие как Detox компании Ribit's, Quil или Superfos. Предпочтительными адьювантами являются такие как адьювант Фрейнда или GM-CSF. Несколько иммунологических адьювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel 932-33). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотнесены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF-), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, GM-CSF, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США 5849589, отдельно включенный в описание во всей полноте путем ссылки) и действуя как иммуноадьюванты (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 адьювантов в составе вакцин. Теоретически не связанные, CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антигенспецифические 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 Т_{H1}-клеток и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи CD4 Т-клеток. Активация Т_{H1}, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адьювантов, таких как квасцы или неполный адьювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации Т_{H2}. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адьювантную 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, 471-84). В патенте США 6406705 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, TGF-бета, рецептору TNP-альфа) 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, резимиквимод, GM-CSF, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, интерферон-альфа, олигонуклеотиды CpG и производные, поли-(I:C) и производные, РНК, силденафил и составы из твердых частиц 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 (GM-CSF, сарграмостим), имиквимод, резимиквимод и интерферон-альфа.

В предпочтительном варианте осуществления для фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, сарграмостим), имиквимод и резимиквимод.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювантом является имиквимод и резимиквимод.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутрикожное, внутримышечное или оральное введение. Для этого пептиды и факультативно другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном носителе. Кроме того, композиция может содержать такие вспомогательные вещества, как буферы, связующие агенты, разрушающие агенты, разбавители, ароматизаторы, смазывающие вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены вместе с иммуностимулирующими веществами, такими как цитокины. Пространственный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, может быть взят, например, из работы А. Kibbe, "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3. Ed., 2000, изд. "American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press". Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и/или лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Отдельные примеры составов могут быть взяты, например, из EP 2113253.

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

В настоящем изобретении также предлагается комплект, включающий:

(a) контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, как описанная выше, в виде раствора или в лиофилизированной форме;

(b) факультативно - второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава; и

(c) факультативно - инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению раствора и/или по применению лиофилизированного состава.

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

Комплект согласно настоящему изобретению предпочтительно включает лиофилизированный со-

став настоящего изобретения в подходящем контейнере и инструкции для его восстановления и/или по его применению. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы (например, двухкамерные ампулы), шприцы (такие как двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть сделан из разных материалов, таких как стекло или пластмасса. Предпочтительный комплект и/или контейнер содержит инструкции на контейнере, которые дают указания для восстановления и/или применения. Например, на этикетке может быть указано, что лиофилизированный состав должен восстанавливаться 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 ампулой многоразового использования, которая позволяет повторное введение (например, от 2-6 введений) восстановленного состава. Комплект может дополнительно включать второй контейнер, включающий подходящий разбавитель (например, раствор бикарбоната натрия).

При смешивании разбавителя и лиофилизованного состава окончательная концентрация пептида в восстановленном составе составляет, предпочтительно по меньшей мере 0,15 мг/мл/пептид (=75 мкг) и предпочтительно не более чем 3 мг/мл/пептид (=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.

Комплекты по изобретению предпочтительно включают состав по изобретению, упакованный для применения в комбинации с совместным введением второго соединения (таким как адъювант (например, GM-CSF), химиотерапевтическое средство, натуральный продукт, гормон или антагонист, средства против ангиогенеза или ингибитора ангиогенеза; апоптоз-индуцирующие средства или хелаторы) или их фармацевтическую композицию. Компоненты комплекта до введения пациенту могут предварительно быть смешаны или же каждый компонент может находиться в индивидуальном контейнере. Компоненты комплекта могут быть предоставлены в виде одного или нескольких жидкостных 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, предпочтительным образом, предоставляются в другом, отдельном, контейнере.

Контейнер терапевтического комплекта может быть ампулой, пробиркой, колбой, флаконом, шприцем или любыми другими средствами, заключающими в себе твердое вещество или жидкость. Обычно, если имеются более одного компонента, комплект содержит второй флакон или другой контейнер, который позволяет произвести отдельную дозировку. Комплект может также содержать другой контейнер для фармацевтически приемлемой жидкости. Лечебный комплект будет предпочтительно содержать аппарат (например, одну или более иглы, шприцы, пипетки для глаз, 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, внутривенный, внутримышечный, внутримышечный или трансдермальный способ. Предпочтительно, чтобы введение было s.c. и наиболее предпочтительно i.d. Введение может производиться инфузионным насосом.

Поскольку пептиды по изобретению, полученные из MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAR2C, AVL9, UQCRB и MUC6, были выделены из клеток рака желудка, лекарственное средство по изобретению предпочтительно применяется для лечения рака желудка.

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 цитаты описания включены в их целостности путем ссылки.

Примеры

Пример 1. Идентификация опухолеассоциированных пептидов, презентуемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были предоставлены Медицинским университетом префектуры Киото (KPMU), Киото, Япония, Школой медицины Осацкого университета (OCU), Осака, Япония и Университетским госпиталем г. Тюбинген, Германия. Перед проведением хирургической операции было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после операции ткани были подвергнуты шоковой заморозке в жидком азоте и хранились до изоляции TUMAP-пептидов при -80°C.

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

Пулы комплексов пептид-HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были получе-

ны методом иммунопреципитации из плотных тканей в соответствии с незначительно измененным протоколом (Falk и соавт. 1991; Seeger, F.H. и соавт. 1999) при использовании HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, HLA-A*02-специфического антитела BB7.2, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

Методы

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью ОФ хроматографией (nanoAcquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридном масс-спектрометре LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific), снабженном источником ESI. Пулы пептидов загружали непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленого кварца (75 мкм внутр.д. × 250 мм) с материалом для обратнофазовой хроматографии 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% 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 nanoESI. Масс-спектрометр LTQ-Orbitrap работал в зависимом от данных режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на спектрометре Orbitrap ($R = 30000$), за чем следовало сканирование MS/MS на Orbitrap ($R = 7500$) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Tandемные масс-спектры интерпретировали на SEQUEST с дополнительным ручным управлением. Идентифицированную пептидную последовательность подтверждали сравнением генерированной 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 CDC2-001, ассоциированного с МНС класса I, и его профиля элюции на системе UPLC.

Пример 2. Профили экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

Не все пептиды, идентифицированные как презентруемые на поверхности опухолевых клеток молекулами МНС, подходят для иммунотерапии, потому что большинство этих пептидов образованы из нормальных клеточных белков, экспрессируемых многими видами клеток. Только немногие из этих пептидов являются опухолеассоциированными и, вероятно, способны индуцировать Т-клетки с высокой специфичностью распознавания для опухоли, из которой они были получены. В целях идентификации таких пептидов и минимизации риска аутоиммуности, вызванной при вакцинации, авторы данного изобретения сосредоточили свое внимание на тех пептидах, которые получены из белков, гиперэкспрессированных на опухолевых клетках в сравнении с большинством нормальных тканей.

Идеальный пептид может быть получен из белка, являющимся уникальным для опухоли и не присутствующим ни в одной другой ткани. Для идентификации пептидов, которые образованы из генов с профилем экспрессии, близким к идеальному, идентифицированные пептиды соотносили с белками и генами, соответственно, из которых они были образованы, и строили профили экспрессии этих генов.

Источники и приготовление РНК

Хирургически удаленные образцы тканей были предоставлены различными клиническими центрами (см. Пример 1) после получения письменной формы информированного согласия от каждого пациента. Образцы опухолевой ткани были мгновенно заморожены в жидком азоте после операции и гомогенизированы позже 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, Хантингдон, Великобритания; Clontech, Гейдельберг, Германия; Stratagene, Амстердам, Нидерланды; BioChain, Хейвард, Калифорния, США). РНК нескольких индивидов (от 2 до 123 индивидов) была смешана таким образом, что РНК каждого индивида имела равную массу. Лейкоциты были выделены из образцов крови 4 здоровых добровольцев.

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 микроматрицами

Анализ экспрессии генов всех образцов РНК из опухолевой и нормальной ткани был произведен с помощью олигонуклеотидных микроматриц 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., Фарминггейл, Нью-Йорк, США) для матриц U133A или набора GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для матриц 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 GeneChip 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.

Профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени гиперэкспрессированы в клетках рака желудка, представлены на фиг. 2.

Пример 3. Иммуногенность *in vitro* для пептидов, презентуемых МНС I класса, в IMA941

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению были проведены исследования с использованием хорошо известных методов стимуляции, уже описанных в работе (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, and Stanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J.Immunol., 171, 4974-4978). С использованием этой системы была показана положительная иммуногенность (т.е. размножение специфических Т-клеток) для 47 из 54 проанализированных пептидов TUMAP, рестриктированных по HLA-A*2402, и для 3 из 3 проанализированных пептидов TUMAP по изобретению, рестриктированных по HLA-A*0201, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека существуют CD8+ Т-клетки-предшественники (табл. 4).

Прайминг CD8+ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексом пептид-МНС (pMHC) и антителом к CD28, сначала были выделены CD8 Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*24 или из лейкоцитарной пленки HLA-A*2 здоровых доноров, полученных из Банка крови г. Тюбингена, Германия.

CD8 Т-клетки, непосредственно обогащенные либо из продукта лейкофереза, либо из РВМС (мононуклеарные клетки периферической крови) сначала выделяли с помощью среды градиентного разделения стандартной плотности (РАА, Кельбе, Германия). Выделенные CD8-лимфоциты или РВМС 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, Вербье, Бельгия), 1 мМ пирувата натрия (СС Pro, Нойштадт, Германия) и 20 мкг/мл гентамицина (Cambrex). Цитокины с концентрацией 2,5 нг/мл ИЛ-7 (PromoCell, Гайдельберг, Германия) и 10 Ед/мл ИЛ-2 (Novartis Pharma, Нюрнберг, Германия) также добавляли в среду ТСМ на этом этапе культивирования. Выделение лимфоцитов CD8+ производили методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия).

Получение микросфер, покрытых pMHC/анти-CD28, Т-клеточные стимуляции и считывание производили, как описывалось ранее (Walter и соавт., 4974-78), с минимальными модификациями. Вкратце, были получены биотинилированные нагруженные пептидом рекомбинантные молекулы HLA-A*2402 и HLA-A*0201, без трансмембранного домена, и которые были биотинилированы на карбоксильном конце тяжелой цепи. Очищенный костимулированный IgG2a мыши к антителам человека CD28 Ab 9,3 (ung, Ledbetter, and Muller-Eberhard 4611-15) был биотинилирован химическим способом с использованием сульфо-N-гидроксисукцинимидобиотина, как рекомендуется изготовителем (Perbio, Бонн, Германия). Исползованные микросферы представляли собой полистироловые частицы размером 5,6 мкм, покрытые стрептавидином (Bangs Laboratories, Иллиной/США). pMHC, использованные в качестве положительного и отрицательного контроля иммуногенности, были А*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV из модифицированного Melan-A/MART-1) и А*0201/DDX5-001 (YLLPAIVNI из DDX5) соответственно.

800000 микросфер/200 мкл помещали в лунки 96-луночного планшета в присутствии 600 нг биотинилированных анти-CD28 и 200 нг релевантного биотин-pMHC (высокоплотные микросферы). Стимуляции были инициированы в 96-луночных планшетах при совместной инкубации 1×10^6 CD8+ Т-клеток с 2×10^5 промытых микросфер с покрытием в 200 мкл среды ТСМ с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3-4 дней при 37°C, 5% CO₂ и 95% относительной влажности. Половина среды была заменена на свежую ТСМ 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.

Наконец, проводили анализы мультимеров окрашиванием клеток с помощью флуоресцентных мультимеров А*0201 или А*2402 HLA (полученными, как описывается в работе (Altman, 1996 ALTMAN1996/id) и клоном SK1 антитела CD8-FITC (BD, Гейлельберг, Германия) или дополнительной помощью маркера жизнеспособности (веществом Live/dead-Aqua или - фиолетовым красителем (Invitrogen, Карлсруэ, Германия)), и измерения проводили на четырехцветном цитометре FACSCalibur (BD) или цитометре LSRII SORP (BD; восемнадцать цветов, оснащенного синим (488 нм), фиолетовым (405 нм), красным (640 нм) и зеленым (532 нм) светофильтрами, соответственно. Пептидспецифические клетки

были подсчитаны как процентная доля всех CD8+ Т-клеток. Оценку результатов мультимерного анализа проводили с помощью компьютерной программы FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Прайминг *in vitro* специфических мультимер-положительных CD8+ лимфоцитов оценивали установкой подходящего дискриминационного окна и 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% специфических мультимер-положительных среди CD8-положительных Т-клеток) и процентная доля специфических мультимер-положительных клеток была по меньшей мере в 10 раз выше среднего значения стимуляций соответствующего отрицательного контроля (стимуляция несоответствующими и окрашивающие соответствующими мультимерами) и клетки не находились на диагонали диаграммы).

Иммуногенность *in vitro* для пептидов IMA941

Для 47 из 54 исследованных пептидов HLA-A*2402 и для 3 из 3 исследованных пептидов HLA-A*0201, могла быть продемонстрирована иммуногенность *in vitro* за счет получения пептид-специфических Т-клеточных линий. Пример результатов цитометрии после TUMAP-специфического мультимерного окрашивания для двух пептидов по изобретению показаны на фиг. 3 вместе с соответствующим отрицательным контролем. Результаты для 54 пептидов A*2402 и 3 A*0201 по изобретению обобщаются в табл. 4.

Таблица 4. Иммуногенность пептидов HLA I класса по изобретению *in vitro*

Результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных фирмой Immatics показывают процентную долю доноров и лунок с положительными результатами и лунок среди тех, что подлежали оценке. По меньшей мере четыре донора и 48 лунок каждого пептида подлежали оценке.

№ последовательности	Антиген	Доноры положительных/оцениваемых [%]	Лунки положительных/оцениваемых [%]
1	CDC2-001	83	28
2	ASPM-002	67	32
18	MMP3-001	11	1
4	MET-006	67	21
3	UCHL5-001	75	12
7	MST1R-001	50	13
33	KIF2C-001	17	2
9	SMC4-001	73	10
17	EPHA2-005	0	0
5	PROM1-001	83	26
6	MMP11-001	33	11
8	NFYB-001	50	7
16	ASPM-001	17	3
20	PLK4-001	60	5
14	ABL1-001	83	18
26	ATAD2-001	33	3
21	ATAD2-002	17	1
27	ATAD2-003	0	0
12	AVL9-001	100	31
22	COL12A1-001	0	0
23	COL6A3-001	0	0
24	FANCI-001	17	1
28	HSP90B1-001	50	7
15	MUC6-001	83	22
13	NUF2-001	100	50
19	NUF2-002	50	6
11	PPAP2C-001	83	29
25	RPS11-001	17	3
29	SIAH2-001	50	8
30	SLC6A6-001	17	1

10	UQCRB-001	83	24
31	IQGAP3-001	100	24
32	ERBB3-001	83	
	CCDC88A-001	0	0
	CCNB1-003	33	3
	CCND2-001	17	10
	CCNE2-001	0	0
	CEA-010	40	3
	CLCN3-001	33	6
	DNAJC10-001	50	15
	DNAJC10-002	33	3
	EIF2S3-001	17	1
	EIF3L-001	100	29
	EPPK1-001	17	1
	GPR39-001	50	6
	ITGB4-001	67	20
	LCN2-001	17	1
	SDHC-001	33	3
	PBK-001	0	0
	POLD3-001	67	7
	PSMD14-001	17	1
	PTK2-001	17	4
	TSPAN1-002	17	1
	ZNF598-001	83	17

Приведенные ниже пептиды уже были описаны в других патентных заявках фирмы immatics и включены в вакцины IMA901 (MET-001 и TOP-001), IMA910 (MET-001 и TOP-001) и IMA950 (IGF2BP3-001). Поскольку, например, пептид MET-001 приводит к чрезвычайно хорошим реакциям *in vivo*, данные могут рассматриваться как сведения пригодности пептидов по изобретению для клинического применения.

№ последовательности	Антиген	донорская положительная/оцениваемая [%]	Лунки положительная/оцениваемая [%]
	IGF2BP3-001	50	21
	MET-001	67	42
	TOP-001	40	10

Список литературы

- Ahmed, A. U., et al. "Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth." J Natl.Cancer Inst. 100.22 (2008): 1606-29.
- Allison, J. P. and M. F. Krummel. "The Yin and Yang of T cell costimulation." Science 270.5238 (1995): 932-33.
- Altmeyer, A., et al. "Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96." Int J Cancer 69.4 (1996): 340-49.
- Appay, V., et al. "Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide." Eur.J Immunol. 36.7 (2006): 1805-14.
- Banerjee, S. K., et al. "Expression of cdc2 and cyclin B1 in Helicobacter pylori-associated gastric MALT and MALT lymphoma : relationship to cell death, proliferation, and transformation." Am J Pathol. 156.1 (2000): 217-25.
- Bartman, A. E., et al. "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps." Int J Cancer 80.2 (1999): 210-18.
- Basu, S., et al. "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol. 12.11 (2000): 1539-46.
- Bauer, B., S. Bartfeld, and T. F. Meyer. "H. pylori selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA." Cell Microbiol. 11.1 (2009): 156-69.
- Benatti, P., et al. "A balance between NF-Y and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response." Nucleic Acids Res 36.5 (2008): 1415-28.
- Bertolini, G., et al. "Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 106.38 (2009): 16281-86.
- Bierie, B. and H. L. Moses. "TGF-beta and cancer." Cytokine Growth Factor Rev. 17.1-2 (2006): 29-40.
- Bitoun, E. and K. E. Davies. "The robotic mouse: unravelling the function of AF4 in the cerebellum." Cerebellum. 4.4 (2005): 250-60.
- Bolhassani, A. and S. Rafati. "Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development." Expert.Rev.Vaccines. 7.8 (2008): 1185-99.
- Borset, M., et al. "The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies." Leuk.Lymphoma 32.3-4 (1999): 249-56.
- Bradbury, P. A., et al. "Matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk and prognosis." Carcinogenesis 30.5 (2009): 793-98.
- Brown, C. E., et al. "Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells." Cancer Research 69.23 (2009): 8886-93.
- Bruckdorfer, T., O. Marder, and F. Albericio. "From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future." Curr.Pharm.Biotechnol. 5.1 (2004): 29-43.
- Brunsvig, P. F., et al. "Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer." Cancer Immunol.Immunother. 55.12 (2006): 1553-64.

- Cabanes, D., et al. "Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein." EMBO J 24.15 (2005): 2827-38.
- Calzado, M. A., et al. "An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response." Nat.Cell Biol. 11.1 (2009): 85-91.
- Castelli, C., et al. "Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer." Cancer Immunol.Immunother. 53.3 (2004): 227-33.
- Castriconi, R., et al. "Both CD133+ and C." Eur.J Immunol. 37.11 (2007): 3190-96.
- Chanock, S. J., et al. "HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA." Hum.Immunol. 65 (2004): 1211-23.
- Chen, C. H., et al. "Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100.16 (2003): 9226-31.
- Chen, Z. and J. J. O'Shea. "Regulation of IL-17 production in human lymphocytes." Cytokine 41.2 (2008): 71-78.
- Cho, S. O., et al. "Helicobacter pylori in a Korean Isolate Expressed Proteins Differentially in Human Gastric Epithelial Cells." Dig.Dis.Sci. (2009).
- Christianson, J. C., et al. "OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD." Nat.Cell Biol. 10.3 (2008): 272-82.
- Cisek, L. J. and J. L. Corden. "Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2." Nature 339.6227 (1989): 679-84.
- Colombetti, S., et al. "Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin." J Immunol. 176.5 (2006): 2730-38.
- Confalonieri, S., et al. "Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor." Oncogene 28.33 (2009): 2959-68.
- Corso, S., et al. "Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases." Oncogene 27.5 (2008): 684-93.
- Cox, C. V., et al. "Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL." Blood 113.14 (2009): 3287-96.
- Cunha-Ferreira, I., et al. "The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4." Curr.Biol. 19.1 (2009): 43-49.
- DeLuca, J. G., et al. "Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites." Mol.Biol.Cell 16.2 (2005): 519-31.
- Deng, H., et al. "Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells." Biochem.Biophys.Res Commun. 326.2 (2005): 274-81.
- Dengjel, J., et al. "Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas." Clin Cancer Res. 12.14 (2006): 4163-70.
- Deremer, D. L., C. Ustun, and K. Natarajan. "Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia." Clin Ther. 30.11 (2008): 1956-75.

- Di Renzo, M. F., et al. "Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer." Clin.Cancer Res. 1.2 (1995): 147-54.
- Dong, G., et al. "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Res. 61.15 (2001): 5911-18.
- Dudley, M. E., et al. "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science 298.5594 (2002): 850-54.
- Dudley, M. E., et al. "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." J.Clin.Oncol. 23.10 (2005): 2346-57.
- Duong, C., et al. "Pretreatment gene expression profiles can be used to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal cancer." Ann Surg Oncol 14.12 (2007): 3602-09.
- Egland, K. A., et al. "High expression of a cytokeratin-associated protein in many cancers." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 103.15 (2006): 5929-34.
- Eramo, A., et al. "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ 15.3 (2008): 504-14.
- Esashi, F., et al. "CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair." Nature 434.7033 (2005): 598-604.
- Escobar, M. A., et al. "Profiling of nuclear extract proteins from human neuroblastoma cell lines: the search for fingerprints." J Pediatr.Surg 40.2 (2005): 349-58.
- Ferracini, R., et al. "The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit." Oncogene 10.4 (1995): 739-49.
- Fischer, J., et al. "Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours." Oncogene 17.6 (1998): 733-39.
- Flanagan, J. M., et al. "Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets." Mol.Cancer Ther. 8.1 (2009): 249-60.
- Fong, L., et al. "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.15 (2001): 8809-14.
- Frasor, J., et al. "Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 102.37 (2005): 13153-57.
- Frew, I. J., et al. "Generation and analysis of Siah2 mutant mice." Mol.Cell Biol. 23.24 (2003): 9150-61.
- Fu, Y. and A. S. Lee. "Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy." Cancer Biol.Ther. 5.7 (2006): 741-44.
- Furge, K. A., et al. "Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10722-27.
- Furge, K. A., Y. W. Zhang, and G. F. Vande Woude. "Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins." Oncogene 19.49 (2000): 5582-89.

- Gattinoni, L., et al. "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." Nat.Rev.Immunol. 6.5 (2006): 383-93.
- Gherardi, E. and M. Stoker. "Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met." Cancer Cells 3.6 (1991): 227-32.
- Glen, A., et al. "iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression." J Proteome.Res 7.3 (2008): 897-907.
- Gnjatic, S., et al. "NY-CO-58/KIF2C is overexpressed in a variety of solid tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer." Int J Cancer (2009).
- Guo, W. C., et al. "Expression and its clinical significance of heat shock protein gp96 in human osteosarcoma." Neoplasma 57.1 (2010): 62-67.
- Habelhah, H., et al. "Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2." EMBO J 21.21 (2002): 5756-65.
- Hamamoto, A., et al. "Aberrant expression of the gastric mucin MUC6 in human pulmonary adenocarcinoma xenografts." Int J Oncol 26.4 (2005): 891-96.
- Harada, T., et al. "Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques." Pancreatology 9.1-2 (2009): 13-24.
- Harper, L. J., et al. "Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma." J Oral Pathol.Med 36.10 (2007): 594-603.
- Hayama, S., et al. "Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis." Cancer Research 66.21 (2006): 10339-48.
- Hayashi, M., et al. "High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer." Clinical Cancer Research 14.23 (2008): 7843-49.
- Heike, M., et al. "Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer." Int J Cancer 86.4 (2000): 489-93.
- Hodorova, I., et al. "Gp96 and its different expression in breast carcinomas." Neoplasma 55.1 (2008): 31-35.
- Horton, R. A., et al. "A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein." Anal.Biochem. 360.1 (2007): 138-43.
- House, C. M., A. Moller, and D. D. Bowtell. "Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways." Cancer Research 69.23 (2009): 8835-38.
- Howard, E. W., et al. "Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer." Clin Exp.Metastasis 25.5 (2008): 497-508.
- Hu, G. and E. R. Fearon. "Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins." Mol.Cell Biol. 19.1 (1999): 724-32.
- Huang, Y., et al. "Characterization of GPR56 protein and its suppressed expression in human pancreatic cancer cells." Mol.Cell Biochem. 308.1-2 (2008): 133-39.

- Jansen, M. P., et al. "Downregulation of SIAH2, an ubiquitin E3 ligase, is associated with resistance to endocrine therapy in breast cancer." Breast Cancer Res Treat. 116.2 (2009): 263-71.
- Jia, H. L., et al. "Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma." Clinical Cancer Research 13.4 (2007): 1133-39.
- Jucker, M., et al. "The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma." Leuk.Res. 18.1 (1994): 7-16.
- Jung, G., J. A. Ledbetter, and H. J. Muller-Eberhard. "Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates." Proc Natl Acad Sci U S A 84.13 (1987): 4611-15.
- Jung, H. M., S. J. Choi, and J. K. Kim. "Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers." J Cell Biochem. 106.4 (2009): 703-13.
- Kaneko, N., et al. "siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis." Biochem.Biophys.Res Commun. 390.4 (2009): 1235-40.
- Kang, H. M., et al. "Effects of Helicobacter pylori Infection on gastric mucin expression." J Clin Gastroenterol. 42.1 (2008): 29-35.
- Ko, M. A., et al. "Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis." Nat.Genet. 37.8 (2005): 883-88.
- Kobayashi, M., et al. "Activation of ErbB3-PI3-kinase pathway is correlated with malignant phenotypes of adenocarcinomas." Oncogene 22.9 (2003): 1294-301.
- Koochekpour, S., et al. "Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas." Cancer Res. 57.23 (1997): 5391-98.
- Korzeniewski, N., et al. "Cullin 1 functions as a centrosomal suppressor of centriole multiplication by regulating polo-like kinase 4 protein levels." Cancer Research 69.16 (2009): 6668-75.
- Krieg, A. M. "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat.Rev.Drug Discov. 5.6 (2006): 471-84.
- Kunimoto, K., et al. "Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development." J Cell Physiol 220.3 (2009): 621-31.
- Kuriyama, R., et al. "Gamma-tubulin-containing abnormal centrioles are induced by insufficient Plk4 in human HCT116 colorectal cancer cells." J Cell Sci. 122.Pt 12 (2009): 2014-23.
- Lee, H. S., et al. "MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as prognostic indicators." Cancer 92.6 (2001): 1427-34.
- Leivo, I., et al. "Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation." Cancer Genet.Cytogenet. 156.2 (2005): 104-13.
- Lemmel, C., et al. "Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling." Nat.Biotechnol. 22.4 (2004): 450-54.
- Li, G., et al. "Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development." Oncogene 20.56 (2001): 8125-35.

- Lim, S. O., et al. "Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules." World J Gastroenterol. 11.14 (2005): 2072-79.
- Lin, W., et al. "Tyrosine kinases and gastric cancer." Oncogene 19.49 (2000): 5680-89.
- Liu, B. and Z. Li. "Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin." Blood 112.4 (2008): 1223-30.
- Liu, S. Y., et al. "Requirement of MMP-3 in anchorage-independent growth of oral squamous cell carcinomas." J Oral Pathol.Med 36.7 (2007): 430-35.
- Lochter, A., et al. "The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression." Ann N.Y.Acad.Sci. 857 (1998): 180-93.
- Lund, C. V., et al. "Zinc finger transcription factors designed for bispecific coregulation of ErbB2 and ErbB3 receptors: insights into ErbB receptor biology." Mol.Cell Biol. 25.20 (2005): 9082-91.
- Ma, S., et al. "Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells." Gastroenterology 132.7 (2007): 2542-56.
- MacLeod, R. J., M. Hayes, and I. Pacheco. "Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells." Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol 293.1 (2007): G403-G411.
- Macmillan, J. C., et al. "Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer." Ann Surg Oncol 8.9 (2001): 729-40.
- Maney, T., et al. "The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view." Int Rev.Cytol. 194 (2000): 67-131.
- Martin, C. M., et al. "Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy." Methods Mol.Biol. 511 (2009): 333-59.
- Matsukita, S., et al. "Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma." Histopathology 42.1 (2003): 26-36.
- Maulik, G., et al. "Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition." Cytokine Growth Factor Rev. 13.1 (2002): 41-59.
- Mizrak, D., M. Brittan, and M. Alison. "CD133: molecule of the moment." J Pathol. 214.1 (2008): 3-9.
- Montesano, R., et al. "Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis." Cell Growth Differ. 9.5 (1998): 355-65.
- Monzani, E., et al. "Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential." Eur.J Cancer 43.5 (2007): 935-46.
- Moore, A. and L. Wordeman. "The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis." Trends Cell Biol. 14.10 (2004): 537-46.
- Morgan, R. A., et al. "Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes." Science (2006).
- Mori, M., et al. "HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry." Transplantation 64.7 (1997): 1017-27.

- Murray, G. I., et al. "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer." Gut 43.6 (1998): 791-97.
- Murshid, A., J. Gong, and S. K. Calderwood. "Heat-shock proteins in cancer vaccines: agents of antigen cross-presentation." Expert.Rev.Vaccines, 7.7 (2008): 1019-30.
- Nakaigawa, N., et al. "Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma." Cancer Res, 66.7 (2006): 3699-705.
- Nakamura, Y., et al. "Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer." Br.J.Cancer 97.4 (2007): 543-49.
- Nakayama, K., J. Qi, and Z. Ronai. "The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response." Mol.Cancer Res 7.4 (2009): 443-51.
- Naldini, L., et al. "Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET." Oncogene 6.4 (1991): 501-04.
- Nguyen, Q. N., et al. "Light controllable siRNAs regulate gene suppression and phenotypes in cells." Biochim.Biophys.Acta 1758.3 (2006): 394-403.
- Nishio, K., et al. "Crystal structure of the de-ubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain." Biochem.Biophys.Res Commun, 390.3 (2009): 855-60.
- Nojima, H., et al. "IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade." Nat.Cell Biol, 10.8 (2008): 971-78.
- Nomura, H., et al. "Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas." Int J.Cancer 69.1 (1996): 9-16.
- Nomura, H., et al. "Network-based analysis of calcium-binding protein genes identifies Grp94 as a target in human oral carcinogenesis." Br.J.Cancer 97.6 (2007): 792-801.
- Ohnuma, S., et al. "Cancer-associated splicing variants of the CDCA1 and MSMB genes expressed in cancer cell lines and surgically resected gastric cancer tissues." Surgery 145.1 (2009): 57-68.
- Park, Y. H., et al. "Capecitabine in combination with Oxaliplatin (XELOX) as a first-line therapy for advanced gastric cancer." Cancer Chemother.Pharmacol, (2007).
- Pascolo, S., et al. "The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells." Int.Immunol, 17.2 (2005): 117-22.
- Peel, N., et al. "Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation." Curr.Biol, 17.10 (2007): 834-43.
- Pereira, M. B., et al. "Immunohistochemical study of the expression of MUC5AC and MUC6 in breast carcinomas and adjacent breast tissues." J Clin Pathol, 54.3 (2001): 210-13.
- Pietra, G., et al. "Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells." Int Immunol, 21.7 (2009): 793-801.
- Poller, D. N., et al. "Production and characterization of a polyclonal antibody to the c-erbB-3 protein: examination of c-erbB-3 protein expression in adenocarcinomas." J Pathol, 168.3 (1992): 275-80.
- Pons, E., C. C. Uphoff, and H. G. Drexler. "Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines." Leuk.Res, 22.9 (1998): 797-804.

- Ponzetto, C., et al. "A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor." Mol.Cell Biol. 13.8 (1993): 4600-08.
- Poppe, M., et al. "Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility." Oncogene 26.24 (2007): 3462-72.
- Pytel, D., et al. "Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy." Anticancer Agents Med Chem. 9.1 (2009): 66-76.
- Qi, J., et al. "The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 105.43 (2008): 16713-18.
- Qian, C. N., et al. "Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma." Cancer Res. 62.2 (2002): 589-96.
- Qian, Z., et al. "Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia." Chem.Biol.Interact. (2009).
- Ramirez, R., et al. "Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma." Clin Endocrinol.(Oxf) 53.5 (2000): 635-44.
- Rammensee, H. G., et al. "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics 50.3-4 (1999): 213-19.
- Rammensee, H. G., J. Bachmann, and S. Stevanovic. MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1997.
- Rappa, G., O. Fodstad, and A. Loricco. "The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma." Stem Cells 26.12 (2008): 3008-17.
- Richardson, G. D., et al. "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." J Cell Sci. 117.Pt 16 (2004): 3539-45.
- Rini, B. I., et al. "Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy." Cancer 107.1 (2006): 67-74.
- Rodrigues-Martins, A., et al. "Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis." Science 316.5827 (2007): 1046-50.
- Rosenberg, S. A., et al. "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." N.Engl.J.Med. 316.15 (1987): 889-97.
- Rosenberg, S. A., et al. "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." N.Engl.J Med 319.25 (1988): 1676-80.
- Rott, R., et al. "Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells." J Biol.Chem. 283.6 (2008): 3316-28.
- Rutella, S., et al. "Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors." Clinical Cancer Research 15.13 (2009): 4299-311.

- Saiki, R. K., et al. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239.4839 (1988): 487-91.
- Samant, G. V. and P. W. Sylvester. "gamma-Tocotrienol inhibits ErbB3-dependent PI3K/Akt mitogenic signalling in neoplastic mammary epithelial cells." Cell Prolif. 39.6 (2006): 563-74.
- Sanidas, E. E., et al. "Expression of the c-erbB-3 gene product in gastric cancer." Int J Cancer 54.6 (1993): 935-40.
- Scott, G. K., et al. "Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b." J Biol.Chem. 282.2 (2007): 1479-86.
- Sergina, N. V., et al. "Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3." Nature 445.7126 (2007): 437-41.
- Shah, M., et al. "Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis." Pigment Cell Melanoma Res 22.6 (2009): 799-808.
- Shapiro, G. I. "Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment." J Clin Oncol 24.11 (2006): 1770-83.
- Sherman-Baust, C. A., et al. "Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells." Cancer Cell 3.4 (2003): 377-86.
- Sheu, M. L., S. H. Liu, and K. H. Lan. "Honokiol induces calpain-mediated glucose-regulated protein-94 cleavage and apoptosis in human gastric cancer cells and reduces tumor growth." PLoS.ONE 2.10 (2007): e1096.
- Shimo, A., et al. "Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis." Cancer Sci 99.1 (2008): 62-70.
- Singh, S. K., et al. "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res 63.18 (2003): 5821-28.
- Singh, S. K., et al. "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature 432.7015 (2004): 396-401.
- Sithanandam, G. and L. M. Anderson. "The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy." Cancer Gene Ther. 15.7 (2008): 413-48.
- Sithanandam, G., et al. "Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549." Oncogene 24.11 (2005): 1847-59.
- Skawran, B., et al. "Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma: upregulation of genes in amplified chromosome regions." Mod.Pathol. 21.5 (2008): 505-16.
- Slesak, B., et al. "Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis." Anticancer Res 18.4A (1998): 2727-32.
- Small, E. J., et al. "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." J Clin Oncol 24.19 (2006): 3089-94.
- Smith, L. M., et al. "CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers." Br.J Cancer 99.1 (2008): 100-09.

- Smith, M. J., et al. "Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification." Br.J.Cancer 100.9 (2009): 1452-64.
- Smogorzewska, A., et al. "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair." Cell 129.2 (2007): 289-301.
- Staehler, M., Stenzl, A., Dietrich, P. Y., Eisen, T., Haferkamp, A., Beck, J., Mayer, A., Walter, S., Singh-Jasuja, H., and Stief, C. A phase 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. 6-20-2007.
- Ref Type: Abstract
- Stemmann, O., et al. "Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase." Cell 107.6 (2001): 715-26.
- Suetsugu, A., et al. "Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells." Biochem.Biophys.Res.Comm. 351.4 (2006): 820-24.
- Suva, M. L., et al. "Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma." Cancer Research (2009).
- Swallow, C. J., et al. "Sak/Plk4 and mitotic fidelity." Oncogene 24.2 (2005): 306-12.
- Szczepanowski, M., et al. "Regulation of repp86 stability by human Siah2." Biochem.Biophys.Res Commun. 362.2 (2007): 485-90.
- Tajima, Y., et al. "Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significance and genetic background." Clinical Cancer Research 12.21 (2006): 6469-79.
- Takaishi, S., et al. "Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44." Stem Cells 27.5 (2009): 1006-20.
- Takayama, H., et al. "Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94.2 (1997): 701-06.
- Teofili, L., et al. "Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease." Blood 97.4 (2001): 1063-69.
- Thorsen, K., et al. "Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis." Mol.Cell Proteomics. 7.7 (2008): 1214-24.
- Tirino, V., et al. "The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer." Eur.J Cardiothorac.Surg 36.3 (2009): 446-53.
- Todaro, M., et al. "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4." Cell Stem Cell 1.4 (2007): 389-402.
- Topol, L., et al. "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." J Cell Biol. 162.5 (2003): 899-908.
- Toribara, N. W., et al. "Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning." J Biol.Chem. 268.8 (1993): 5879-85.

- Tsan, M. F. and B. Gao. "Heat shock protein and innate immunity." Cell Mol.Immunol. 1.4 (2004): 274-79.
- Tuck, A. B., et al. "Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma." Am.J.Pathol. 148.1 (1996): 225-32.
- Vairaktaris, E., et al. "Association of -1171 promoter polymorphism of matrix metalloproteinase-3 with increased risk for oral cancer." Anticancer Res 27.6B (2007): 4095-100.
- Vandenbroeck, K., E. Martens, and I. Alloza. "Multi-chaperone complexes regulate the folding of interferon-gamma in the endoplasmic reticulum." Cytokine 33.5 (2006): 264-73.
- Walter, S., et al. "Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres." J.Immunol. 171.10 (2003): 4974-78.
- Wang, Q., et al. "Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance." Cancer Detect.Prev. 29.6 (2005): 544-51.
- Wang, R., et al. "Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice." J.Cell Biol. 153.5 (2001): 1023-34.
- Wang, R. Q. and D. C. Fang. "Effects of Helicobacter pylori infection on mucin expression in gastric carcinoma and pericancerous tissues." J Gastroenterol.Hepatol. 21.2 (2006): 425-31.
- Wang, S., et al. "IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth." J Cell Sci. 120.Pt 4 (2007): 567-77.
- Wang, X., et al. "Immunolocalisation of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in colonic adenocarcinoma." Acta Histochem. 110.2 (2008): 117-23.
- Wang, X. P., et al. "Expression and significance of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human esophageal carcinoma." World J Gastroenterol. 11.3 (2005): 429-32.
- Wang, X. P., et al. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma." World J Gastroenterol. 11.7 (2005): 1056-59.
- Wang, X. P., Q. X. Wang, and X. P. Ying. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human gastric adenocarcinoma." Tohoku J Exp.Med 212.1 (2007): 35-41.
- Weinschenk, T., et al. "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines." Cancer Res. 62.20 (2002): 5818-27.
- White, C. D., M. D. Brown, and D. B. Sacks. "IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis." FEBS Lett. 583.12 (2009): 1817-24.
- Wicks, S. J., et al. "Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway." Biochem.Soc Trans. 34.Pt 5 (2006): 761-63.
- Wicks, S. J., et al. "The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling." Oncogene 24.54 (2005): 8080-84.
- Yajima, S., et al. "Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer." Int J Oncol 31.5 (2007): 1029-37.

- Yang, L., et al. "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." Nature (2008).
- Yang, S., et al. "Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer." Biochim.Biophys.Acta 1772.9 (2007): 1033-40.
- Yao, D. F., et al. "Abnormal expression of HSP gp96 associated with HBV replication in human hepatocellular carcinoma." Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int 5.3 (2006): 381-86.
- Yasui, W., et al. "Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas." Int J Cancer 53.1 (1993): 36-41.
- Yee, C., et al. "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99.25 (2002): 16168-73.
- Yin, S., et al. "CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity." Int.J Cancer 120.7 (2007): 1444-50.
- Yokozaki, H., W. Yasui, and E. Tahara. "Genetic and epigenetic changes in stomach cancer." Int Rev.Cytol. 204 (2001): 49-95.
- Yuan, W., et al. "Expression of EphA2 and E-cadherin in gastric cancer: correlated with tumor progression and lymphogenous metastasis." Pathol.Oncol Res 15.3 (2009): 473-78.
- Yuan, W. J., et al. "Over-expression of EphA2 and EphrinA-1 in human gastric adenocarcinoma and its prognostic value for postoperative patients." Dig.Dis.Sci. 54.11 (2009): 2410-17.
- Zaremba, S., et al. "Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen." Cancer Res. 57.20 (1997): 4570-77.
- Zhang, X., R. M. Kedl, and J. Xiang. "CD40 ligation converts TGF-beta-secreting tolerogenic CD4-8- dendritic cells into IL-12-secreting immunogenic ones." Biochem.Biophys.Res Commun. 379.4 (2009): 954-58.
- Zhang, X. L., et al. "Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer." World J Surg 33.10 (2009): 2112-18.
- Zhao, C., et al. "Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia." Nature (2009).
- Zheng, H., et al. "Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity." J Immunol. 167.12 (2001): 6731-35.
- Zheng, H., et al. "MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays." J Cancer Res Clin Oncol 132.12 (2006): 817-23.
- Zheng, H. C., et al. "Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas." Hum.Pathol. 39.7 (2008): 1042-49.
- Zhou, G., et al. "2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers." Mol.Cell Proteomics. 1.2 (2002): 117-24.
- Zhou, L., et al. "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function." Nature 453.7192 (2008): 236-40.
- Zhu, K. J., et al. "Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells." Int Immunopharmacol. 9.4 (2009): 412-17.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение пептида, выбранного из группы:

а) пептид, состоящий из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 63,

б) пептид в соответствии с а), где указанный пептид включает непептидные связи, и

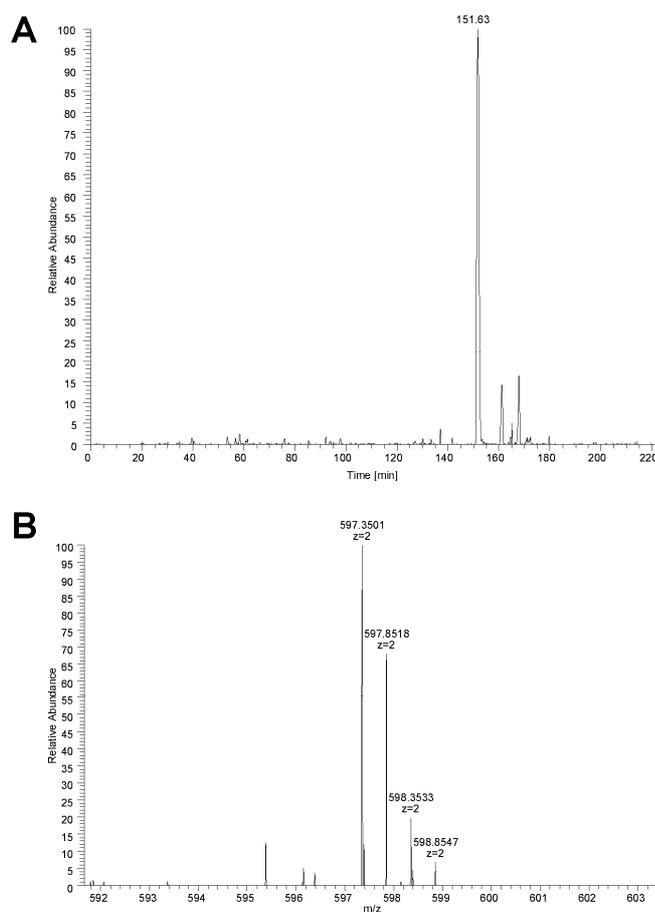
с) пептид в соответствии с а), где указанный пептид является частью слитого белка, включающего N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR, для изготовления лекарственного средства для лечения рака, где указанный рак выбран из рака желудка, желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы, легких или почек.

2. Применение активированного цитотоксического Т-лимфоцита (ЦТЛ), который селективно распознает клетку, которая aberrantly экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в п. 1а),

для изготовления лекарственного средства для лечения рака, где указанный рак выбран из рака желудка, желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы, легких или почек.

3. Применение антитела, специфичного к комплексу МНС/пептид, образованному МНС и пептидом, состоящим из SEQ ID NO: 63, для изготовления лекарственного средства для терапии рака на основе иммунотоксина, где рак выбран из рака желудка, желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы, легких или почек.

4. Применение антитела, специфичного к комплексу МНС/пептид, образованному МНС и пептидом, состоящим из SEQ ID NO: 63, в ELISA, иммуногистохимии, и/или *in vivo* визуализации при раке, выбранном из рака желудка, желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы, легких или почек.

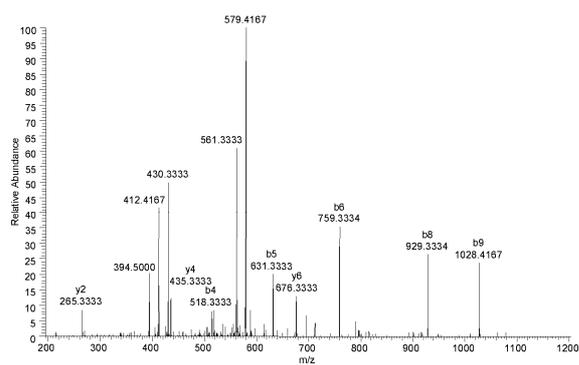


relative abundance → относительная копияность

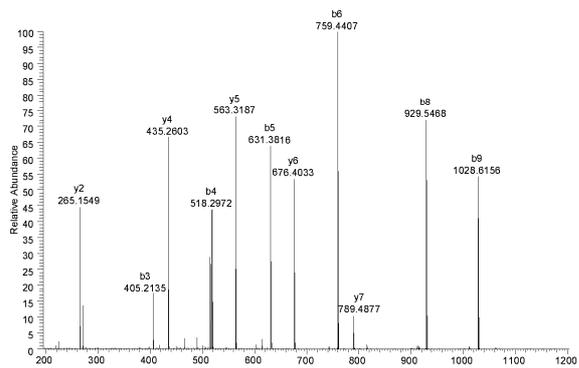
time [min] → время (мин)

039357

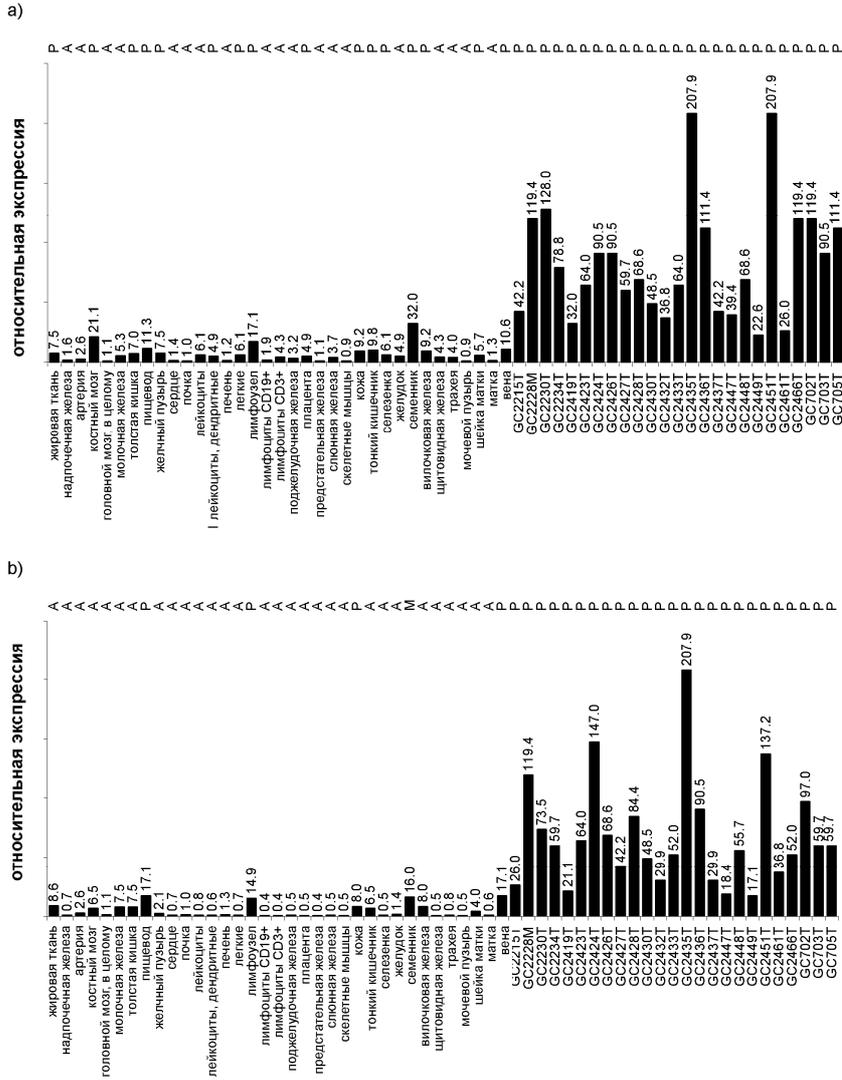
C



D



Фиг. 1



Фиг. 2

