

Prezenta invenție se referă la peptide, proteine, acizi nucleici și celule pentru utilizare în metode imunoterapeutice. În mod special, prezenta invenție se referă la imunoterapia cancerului. În plus, prezenta invenție se referă la epitopii peptidici ai celulelor T citotoxice asociate tumorii, singuri sau asociați cu alte peptide asociate tumorii, care pot servi, de exemplu, drept componente farmaceutice active ale formulelor de vaccin care stimulează răspunsurile imunitare antitumorale sau pentru stimularea celulelor T *ex vivo* și transferarea la pacienți. Peptidele legate de molecule ale complexului major de histocompatibilitate (MHC), sau peptidele ca atare, pot fi, de asemenea, ținte ale anticorpilor, ale receptorilor solubili ai celulelor T și ale altor molecule de legare. În special, prezenta invenție se referă la mai multe secvențe peptidice noi și variantele acestora derivate din moleculele HLA de clasă I și de clasă II ale celulelor tumorale umane care se pot folosi în formule de vaccin pentru inducerea de răspunsuri imunitare antitumorale sau drept ținte pentru dezvoltarea de compuși sau celule active din punct de vedere farmaceutic/imunologic.

Fundamentul invenției

Carcinomul hepatocelular (HCC) este una dintre cele mai frecvente tumori din lume și reprezintă aproximativ 6% din toate cazurile noi de cancer diagnosticate în întreaga lume. În 2012, au apărut în lume aproximativ 782.000 de cazuri noi de HCC, ceea ce îl face al cincilea cel mai frecvent cancer la bărbați (554.000 de cazuri) și al nouălea la femei (228.000 de cazuri) (<http://globocan.iarc.fr>). HCC este cea mai frecventă malignitate hepatică primară, reprezentând peste 80% din toate cazurile de cancer hepatic primar la adulți.

Distribuția HCC variază geografic, iar ratele de incidență depind de sex. Rata de incidență standardizată pe structura de vârstă (ASR) a HCC la bărbați este cea mai ridicată în Asia de Est (31,9) și Asia de Sud-Est (22,2), intermediară în Europa de Sud (9,5) și America de Nord (9,3) și cea mai mică în Europa de Nord (4,6) și Asia Sud-Centrală (3,7). Ratele de incidență a HCC la femei sunt mai mici decât ASR la bărbați. Cea mai mare valoare a ASR la femei apare în Asia de Est (10,2) și Africa de Vest (8,1), cea mai mică în Europa de Nord (1,9) și Micronezia (1,6).

Prognosticul general pentru pacienții cu HCC este slab. Rata de supraviețuire relativă de 5 ani (5Y-RSR) pentru HCC este de aproximativ 15%, în funcție de stadiul din momentul diagnosticării. Pentru HCC localizat, unde cancerul este încă limitat la ficat, 5Y-RSR este de aproximativ 28%. Pentru HCC regional și îndepărtat, unde cancerul a crescut în organe apropiate sau îndepărtate, 5Y-RSR este de 7%, respectiv 2%.

În ultimul timp au fost efectuate un număr limitat de studii de imunoterapie pentru HCC. Au fost utilizate citokine pentru activarea subseturilor de celule imune și/sau creșterea imunogenicității tumorii (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Alte studii s-au concentrat asupra infuziei de limfocite infiltratoare tumorale sau limfocite din sânge periferic activat (Shi et al., 2004a; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

Până în prezent a fost efectuat un număr mic de studii de vaccinare terapeutică. Butterfield et al. au efectuat două studii folosind peptide derivate din alfa-fetoproteină (AFP) ca vaccin sau celule dendritice încărcate cu peptide AFP *ex vivo* (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). În două studii diferite, celule dendritice (DC) autologe au fost pulsate *ex vivo* cu lizat de tumoră autolog sau lizat de linie celulară HepG2 de hepatoblastom (Palmer et al., 2009). Până în prezent, studiile de vaccinare au arătat doar îmbunătățiri limitate ale rezultatelor clinice.

Peptidele fosforilate sunt prezentate, printre altele, în documentul WO 2014/39675.

Rezumatul invenției

Prezenta invenție se referă la o peptidă care cuprinde secvența de aminoacid din SEQ ID NO. 47, așa cum este definită în Revendicarea 1 anexată. Alte aspecte ale invenției sunt definite în revendicările anexate.

Într-un prim aspect se descrie o peptidă care cuprinde o secvență aminoacidică selectată din grupul format din SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă de secvență a acestuia care este de cel puțin 80%, de preferință de cel puțin 90%, omologă (de preferință cel puțin 80% sau cel puțin 90% identică) cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300, în care varianta menționată se leagă de MHC și/sau induce celule T care reacționează încrucișat cu peptida menționată, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, în care peptida menționată nu este polipeptida de bază cu lungime completă.

Este descrisă, de asemenea, o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă a acesteia care este de cel puțin 80%, de preferință de cel puțin 88%, omologă (de preferință cel puțin 80% sau cel puțin 88% identică) cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300, în care peptida menționată sau varianta acesteia are o lungime totală între 8 și 100, de preferință între 8 și 30 și, cel mai preferat, între 8 și 14 aminoacizi.

Tabelele următoare prezintă peptida în conformitate cu prezenta descoperire, valorile lor

SEQ ID NO. respective și gena-sursă (subiacentă) prospectivă pentru această peptidă. Peptida din Tabelul 1 se leagă la HLA-A*02. Peptidele din Tabelul 2 sunt în plus utile pentru diagnosticarea și/sau tratamentul diferitelor malignități care implică o supra-expresie sau supra-prezentare a polipeptidelor respective.

Tabelul 1: Peptide HLA-A*02 în conformitate cu prezenta invenție – S* = fosfoserină

SEQ ID NO.	Secvență	ID-uri gene	Simboluri oficiale de gene
47	FLDTPIAKV	85407	NKD1

În plus, sunt descrise, în general, peptidele în conformitate cu prezenta invenție pentru utilizare în tratamentul bolilor proliferative, cum ar fi, de exemplu, cancerul pancreatic, cancerul de colon sau rectal, cancerul renal, cancerul cerebral și/sau leucemii.

Preferate în mod special sunt peptidele – singure sau în combinație – în conformitate cu prezenta descoperire selectate din grupul format din SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300. Mai preferate sunt peptidele – singure sau în combinație – selectate din grupul format din SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 124 (vezi Tabelul 1), preferabil pentru legarea A*02, și din grupul format din of SEQ ID NO. 187 până la SEQ ID NO. 218, de preferință pentru legarea A*24 și utilizarea lor în imunoterapia de HCC, cancerul cerebral, cancerul renal, cancerul pancreatic, cancerul de colon sau rectal ori leucemie, și, de preferință, HCC.

Așa cum se arată în tabelele următoare 2 și 3, multe dintre peptidele în conformitate cu prezenta invenție pot fi utilizate, de asemenea, în imunoterapia altor indicații. Tabelele arată, pentru peptidele selectate pe care au fost găsite tipuri de tumori suplimentare, prezentând supraprezentare (inclusiv prezentare specifică) pe mai mult de 5% din probele tumorale măsurate sau prezentare pe mai mult de 5% din probele tumorale măsurate cu un raport de medii geometrice tumoare vs. țesuturi normale mai mare de 3. Supraprezentarea este definită ca prezentare mai mare pe proba tumorală în comparație cu proba normală cu prezentarea cea mai mare. Țesuturile normale pe care fost testată supraprezentarea au fost: țesut adipos, glandă suprarenală, celule sanguine, vas sanguin, măduvă osoasă, creier, cartilaj, esofag, ochi, vezică biliară, inimă, rinichi, intestin gros, ficat, plămân, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă paratiroidiană, peritoneu, hipofiză, pleură, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, glandă tiroidă, trahee, ureter, vezică urinară.

Tabelul 2: Peptide în conformitate cu prezenta invenție și utilizările lor specifice în alte boli

proliferative, în special în alte boli canceroase – S* = fosfoserină

SEQ ID NO.	Secvență	Alte organe/boli relevante
47	FLDTPIAKV	Creier, colon, rect

Tabelul 3: Peptide în conformitate cu prezenta invenție și utilizările lor specifice în alte boli proliferative, în special în alte boli canceroase - S* = fosfoserină

SEQ ID NO.	Secvență	Entități suplimentare
47	FLDTPIAKV	NSCLC, GC, cancer esofagian

În mod similar, peptidele specificate în Tabelul 3 de mai sus pot constitui baza pentru – într-o variantă de realizare preferată combinată – tratamentul bolilor așa cum este indicat.

Astfel, un alt aspect al prezentei descrieri se referă la utilizarea peptidelor descrise în prezentul document pentru tratamentul – de preferință combinat – al unei boli proliferative selectate din grupul de HCC, cancer cerebral, cancer renal, cancer pancreatic, cancer de colon sau rectal și leucemie.

Prezenta descoperire se referă, în plus, la peptidele descrise în prezentul document care au capacitatea de a se lega la o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau – într-o formă alungită, cum ar fi o variantă de lungime – sau de clasă II.

Prezenta descoperire se referă și la peptidele descrise în prezentul document în care peptidele respective (fiecare) constau, în esență, dintr-o secvență de aminoacizi în conformitate cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300.

Prezenta invenție se referă în continuare la peptidele descrise în prezentul document, în care respectiva peptidă este modificată și/sau include legături non-peptidice.

Prezenta descoperire se referă suplimentar la peptidele descrise în prezentul document, în care respectiva peptidă face parte dintr-o proteină de fuziune, în special fuzionată cu aminoacizi N-terminali ai lanțului invariant (Ii) asociat cu antigenul HLA-DR sau fuzionată cu un anticorp (sau în secvența unui anticorp), cum ar fi, de exemplu, un anticorp care este specific pentru celulele dendritice.

Prezenta descoperire se referă în continuare la un acid nucleic care codifică peptidele descrise în prezentul document. Prezenta descoperire referă în continuare la acidul nucleic

descriș în prezentul document, care este ADN, ADNc, APN, ARN sau combinații ale acestora.

Prezenta descoperire se referă în continuare la un vector de exprimare care este capabil să exprime și/sau exprimă un acid nucleic așa cum este descriș în prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o peptidă conform descrierii din prezentul document, un acid nucleic conform descrierii din prezentul document sau un vector de exprimare conform descrierii din prezentul document pentru utilizare în tratamentul bolilor, inclusiv cancer și boli patologice autoimune/inflamatorii/imune.

Prezenta descoperire se mai referă la anticorpi împotriva peptidelor descriș în prezentul document sau complexe ale peptidelor menționate în conformitate cu descrierea din prezentul document cu MHC și metode de realizare a acestora.

Prezenta descoperire se referă în continuare la receptori de celule T (TCR), în special TCR solubil (sTCR) și TCR clonate transformate în celule T autologe sau alogene și metode de realizare a acestora, precum și celule NK sau alte celule care poartă respectivul TCR sau care reacționează încrucișat cu TCR-urile menționate.

Anticorpii și TCR sunt exemple de realizare suplimentare ale utilizării imunoterapeutice a peptidelor în conformitate cu invenția la îndemână.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o celulă gazdă cuprinzând un acid nucleic în conformitate cu descrierea din prezentul document sau un vector de exprimare descriș anterior. Prezenta descoperire se referă în continuare la celula-gazdă în conformitate cu descrierea din prezentul document, care este o celulă prezentatoare de antigen și, de preferință, este o celulă dendritică.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o metodă de producere a unei peptide în conformitate cu descrierea din prezentul document, metoda cuprinzând cultivarea celulei gazdă în conformitate cu descrierea din prezentul document și izolarea peptidei din celula gazdă menționată sau din mediul său de cultură.

Prezenta descoperire se referă în continuare la metoda descriș în prezentul document în care antigenul este încărcat pe molecule de MHC de clasă I sau de clasă II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate sau a unei celule prezentatoare de antigen artificiale prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă

prezentatoare de antigen.

Prezenta descoperire se referă în continuare la metoda descrisă în prezentul document în care celula prezentatoare de antigen cuprinde un vector de exprimare capabil să exprime respectiva peptidă care conține SEQ ID NO. 1 până la SQ ID NO. 300, de preferință conținând SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 124 și SEQ ID NO. 187 până la SEQ ID NO. 218 sau o variantă de secvență aminoacidică.

Prezenta descoperire se referă în continuare la celulele T activate produse prin metoda descrisă în prezentul document, în care celula T menționată recunoaște selectiv o celulă care exprimă o polipeptidă cuprinzând o secvență de aminoacizi în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o metodă de ucidere a celulelor țintă la un pacient la care celulele țintă exprimă aberant o polipeptidă cuprinzând orice secvență de aminoacizi în conformitate cu descrierea din prezentul document, metoda cuprinzând administrarea, la pacient, a unui număr eficient de celule T produse în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la utilizarea oricărei peptide descrise, acidul nucleic în conformitate cu prezenta descriere, vectorul de exprimare în conformitate cu prezenta descriere, celula în conformitate cu prezenta descriere, limfocita T activată, receptorul de celule T sau anticorpul sau alte molecule de legare peptidică și/sau MHC în conformitate cu prezenta descriere ca medicament sau la fabricarea unui medicament. De preferință, medicamentul este activ împotriva cancerului.

De preferință, respectivul medicament este pentru o terapie celulară, un vaccin sau o proteină bazată pe un TCR sau anticorp solubil.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu descrierea din prezentul document în care numitele celule canceroase sunt HCC, cancer cerebral, cancer renal, cancer pancreatic, cancer de colon sau rectal sau leucemie și, de preferință, celule HCC.

Prezenta descoperire se referă în continuare la proteine marker și biomarkeri particulari pe baza peptidelor descrise în prezentul document, numite în prezentul document „ținte”, care pot fi utilizate în diagnosticarea și/sau prognosticul CRC. Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la utilizarea acestor ținte noi în contextul tratamentului cancerului.

Există două clase de molecule MHC, MHC de clasă I și MHC de clasă II. Moleculele MHC sunt compuse dintr-un lanț greu alfa și din beta-2 microglobuline (receptori MHC de clasă I) sau, respectiv, dintr-un lanț alfa și un lanț beta (receptori MHC de clasă II). Conformația lor tridimensională prezintă o incizură de legare care este folosită pentru interacțiuni necovalente cu peptide. Moleculele MHC de clasă I pot fi găsite pe majoritatea celulelor nucleate. MHC de clasă I prezintă peptide care rezultă din clivajul proteolitic al proteinelor predominant endogene, produse ribozomale defecte (DRIP) și peptide mai mari. Moleculele MHC de clasă II se pot găsi numai pe celulele „profesioniste” prezentatoare de antigen (APC) și prezintă inițial peptidele unor proteine exogene sau transmembranare captate de APC în timpul endocitozei și care sunt procesate ulterior. Complexele de peptide și MHC de clasă I sunt recunoscute de celule T CD8-pozitive purtătoare de TCR (receptor de celule T) adecvat, în timp ce complexe de peptidă și molecule MHC de clasă II sunt recunoscute de celule T helper CD4-pozitive cu TCR adecvat. Este bine cunoscut faptul că TCR, peptida și MHC sunt prezente în raport stoechiometric 1:1:1.

Celulele T pozitive pentru CD4 joacă un rol important în inducerea și susținerea răspunsurilor efective de către celulele T citotoxice pozitive pentru CD8. Identificarea epitopilor celulelor T CD4-pozitive derivate din antigenii asociați tumorilor (TAA) are o mare importanță pentru dezvoltarea de produse farmaceutice care declanșează răspunsuri imunitare antitumorale (Gnjatic et al., 2003). La locul tumorii, celulele T helper susțin un mediu citokinic favorabil celulelor T (CTL-favorabil) (Mortara et al., 2006) și atrag celulele efectoare, de exemplu CTL-uri, celule NK), macrofage și granulocite (Hwang et al., 2007).

În absența inflamației, exprimarea moleculelor MHC de clasă II este limitată în principal la celulele sistemului imunitar, în special la celulele profesioniste prezentatoare de antigen (APC) cum ar fi monocitele, celulele derivate din monocite, macrofagele sau celulele dendritice. La pacienții cu cancer, celulele tumorale au fost identificate că exprimă molecule MHC de clasă II (Dengjel et al., 2006).

Peptidele alungite (mai lungi) din descoperire pot acționa ca epitopi activi ai MHC de clasă II. Celulele T helper, activate de epitopii MHC de clasă II, joacă un rol important în modularea rolului efector al CTL în imunitatea antitumorală. Epitopii celulelor T care declanșează un răspuns din partea celulelor T helper de tip TH1 susțin funcțiile efectorii ale celulelor T killer CD8, care includ funcții citotoxice îndreptate împotriva celulelor tumorale care prezintă pe suprafața celulară complexe MHC/peptide asociate tumorii.

Astfel epitopii peptidei unei celule T helper asociate tumorii, singur sau asociat cu alte peptide asociate tumorii, poate servi ca ingredient farmaceutic activ al formulelor de vaccin care ar stimula răspunsul imunitar antitumoral.

S-a demonstrat pe modele animale (mamifere), de exemplu șoarece, că chiar și în absența limfocitelor T CD8 pozitive, celulele T CD4-pozitive sunt suficiente pentru inhibarea manifestărilor tumorale prin inhibarea angiogenezei prin sinteza de interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$).

Există dovezi pentru celule T CD4 ca efectori antitumoral direcți (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Deoarece exprimarea constitutivă a moleculelor HLA de clasă II este, de obicei, limitată la celulele imune, posibilitatea de izolare a peptidelor de clasă II direct din tumori primare nu a fost considerată posibilă. Totuși, Dengjel et al. au reușit să identifice un număr de epitopi MHC de clasă II direct din tumori (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Antigenele care sunt recunoscute de limfocitele T citotoxice specifice tumorii, epitopii acestora, pot fi molecule derivate din toate categoriile de proteine, cum ar fi enzimele, receptorii, factorii de transcriere etc. care sunt exprimate și care, comparativ cu celulele nemodificate cu aceeași origine, sunt, de obicei, reglate în sens crescător în celulele respectivei tumori.

Deoarece ambele tipuri de răspuns, CD8 și CD4 dependente, contribuie împreună și sinergic la efectul antitumoral, identificarea și caracterizarea antigenilor asociați tumorii recunoscuți de celule T CD8⁺ (ligand: moleculă MHC de clasă I + epitop peptidă) sau celule T helper CD4-pozitive (ligand: moleculă MHC de clasă II + epitop peptidă) este important în dezvoltarea de vaccinuri tumorale.

Pentru ca o peptidă MHC de clasă II să declanșeze (inducă) un răspuns imunitar celular, trebuie, de asemenea, să se lege de o moleculă MHC. Acest proces depinde de alelele moleculei MHC și de polimorfismele specifice ale secvenței de aminoacizi ai peptidei. Peptidele care leagă MHC de clasă I au de obicei o lungime de 8-12 resturi de aminoacizi și conțin două resturi conservate („ancore”) în secvența acestora, care interacționează cu incizura de legare corespunzătoare a moleculei MHC. Astfel, fiecare alelă MHC are un „motiv de legare” care determină ce peptide se pot lega specific de incizura de legare.

În cazul reacțiile imunitare dependente de MHC de clasă I, peptidele nu numai că se pot

lega de anumite molecule MHC de clasă I exprimate de celulele tumorale, dar trebuie să fie și recunoscute ulterior de celulele T care prezintă receptori specifici pentru celulele T (TCR).

Clasificarea curentă a antigenilor asociați tumorii cuprinde următoarele grupuri principale :

a) Antigeni de cancer testicular: primele AAT identificate vreodată care se pot recunoaște de către celulele T aparțin acestei clase, denumite inițial antigeni de cancer testicular (CT) deoarece exprimarea membrilor clasei se face în diferite tipuri histologice de tumori umane și, la nivelul țesuturilor naturale, are loc numai în spermatocite/spermatogoniile din testicul și, ocazional, în placentă. Deoarece celulele testiculare nu exprimă molecule HLA de clasă I și II, acești antigeni nu pot fi recunoscuți de celulele T în țesuturi normale și prin urmare pot fi considerați specifici tumorii din punct de vedere imunologic specifice tumorii. Exemple bine cunoscute de antigeni CT sunt membrii familiei MAGE sau NY-ESO-1.

b) Antigeni de diferențiere: aceste TAA sunt împărțite între tumori și țesuturi normale din care provin tumorile; majoritatea sunt identificate în melanoame și melanocite normale. Multe dintre aceste proteine derivate din melanocite sunt implicate în biosinteza melaninei și prin urmare nu sunt specifice tumorii, dar sunt totuși folosite pe scară largă pentru imunoterapia cancerului. Exemplele includ, fără a se limita la, tirozinază și Melan-A/MART-1 pentru melanom sau PSA pentru cancer prostatic.

c) TAA supra-exprimate: Genele care codifică TAA-uri larg exprimate au fost depistate în tipuri histologice diferite de tumori precum și în multe țesuturi normale, în general cu niveluri reduse de exprimare. Este posibil ca mulți dintre epitopii procesați și posibil prezentați de țesuturile normale să fie sub nivelul prag pentru recunoașterea de către celulele T, în timp ce supraexprimarea lor în celulele tumorale poate declanșa un răspuns anticanceros prin încălcarea toleranței anterior stabilite. Exemplele cunoscute pentru această clasă de TAA-uri sunt Her-2/neu, survivina, telomeraza sau WT1.

d) Antigeni specifici tumorii: aceste TAA unice apar din mutații ale genelor normale (cum ar fi β -catenina, CDK4 etc.). Unele dintre aceste modificări moleculare sunt asociate cu transformări neoplazice și/sau progresie. Antigenii specifici tumorii sunt în general capabile să inducă un răspuns imunitar puternic fără a purta riscul unor reacții autoimune împotriva țesuturilor normale. Pe de altă parte aceste TAA sunt în majoritatea cazurilor relevante numai tumorii exacte din care au fost identificate și de obicei nu sunt comune mai multor tipuri individuale de tumori.

Specificitatea (sau asocierea) cu tumoarea a unei peptide poate apărea, de asemenea, dacă peptida provine dintr-un exon din tumoare (asociat tumorii) în cazul izoformelor specifice tumorii (asociate tumorii).

e) TAA-uri care apar prin modificări anormale post-translație: aceste TAA apar din proteine care nu sunt nici specifice, nici supra-exprimate în tumori, dar care devin totuși asociate tumorii prin procese post-translaționale active în mod principal în tumori.

Exemplele pentru aceste clase apar din tipare de glicozilare alterată, care duc la epitopi noi în tumori cum ar fi pentru MUC1 sau evenimente de tip scindarea proteinei în timpul degradării, care pot sau nu să fie specifice tumorii.

f) Proteine oncovirale: aceste TAA sunt proteine virale care pot juca un rol critic în procesul oncogen și acestea, deoarece sunt străine (nu au origine umană) pot evoca un răspuns al celulelor T. Exemple de astfel de proteine sunt proteinele papilomavirusului uman de tip 16, E6 și E7, care sunt exprimate în carcinomul cervical.

Pentru ca proteinele să fie recunoscute de limfocitele T citotoxice ca antigene specifice tumorale sau asociate tumorii, și pentru a putea fi utilizate în terapie, trebuie îndeplinite anumite condiții prealabile. Antigenul trebuie să fie exprimat preponderent în celulele tumorale, și deloc sau nici măcar în cantități mici în țesuturile sănătoase. Într-o realizare preferată, peptida trebuie să fie supraprezentată de celulele tumorale comparativ cu țesuturile sănătoase normale. Este, de asemenea, de dorit ca respectivul antigen să nu fie prezent într-un singur tip de tumoare, și să fie prezent în concentrații mari (de exemplu, număr de copii per celulă pentru respectiva peptidă). Antigenii specifici tumorii și asociați tumorii sunt adesea derivate din proteine implicate direct în transformarea unei celule normale într-o celulă tumorale datorită funcției lor, de exemplu, în controlul ciclului celular sau suprimarea apoptozei. Suplimentar, țintele din aval pentru proteinele care cauzează direct transformarea pot fi reglate în sens crescător și prin urmare pot fi asociate indirect tumorii. Acești antigeni asociați indirect tumorii pot fi de asemenea ținta unei abordări de tip vaccinare (Singh-Jasuja et al., 2004). Este esențială prezența epitopilor în secvența de aminoacizi a antigenului pentru a se asigura faptul că o astfel de peptidă („peptidă imunogenă”), fiind derivată dintr-un antigen asociat tumorii, duce la un răspuns *in vitro* sau *in vivo* al celulelor T.

În principiu, orice peptidă care se poate lega de o moleculă MHC poate funcționa ca epitop al celulei T. Cerința prealabilă pentru inducerea unui răspuns al celulelor T, *in vitro* sau *in*

vivo, este prezența unei celule având TCR corespunzător și absența toleranței imunologice pentru acest anumit epitop.

Prin urmare, TAA sunt un punct de plecare pentru dezvoltarea unei terapii bazate pe celule T, incluzând, însă nelimitându-se la vaccinuri tumorale. Metodele pentru identificarea și caracterizarea TAA sunt bazate pe utilizarea de celule T care se pot izola de la pacienți sau subiecți sănătoși sau sunt bazate pe generarea de profiluri diferențiate sau tipare de exprimare diferențiate pentru peptide între tumori și țesuturi normale.

Cu toate acestea, identificarea genelor supraexprimate în țesuturi tumorale sau linii celulare tumorale umane sau exprimate selectiv în astfel de țesuturi sau linii celulare nu asigură informații precise asupra utilizării antigenilor care se transcriu din aceste gene într-un tratament imunitar. Aceasta deoarece numai o subpopulație individuală de epitopi ai acestor antigeni este adecvată pentru o astfel de aplicație deoarece o linie de celule T cu TCR corespunzător trebuie să fie prezentă iar toleranța imunologică pentru acest anumit epitop trebuie să fie absentă sau minimală. Într-un exemplu foarte preferat este, deci, important să se selecteze numai acele peptide prezentate peste sau selectiv împotriva cărora se poate găsi o celulă T funcțională și/sau proliferantă. Astfel de celule T funcționale sunt definite ca celule T care, la stimularea cu un anumit antigen, pot fi extinse clonal și pot executa funcții efector („celule T efectoare”).

În cazul TCR și al anticorpilor conform invenției, imunogenitatea peptidelor subiacente este secundară. Pentru TCR-urile și anticorpii descriși în prezentul document, prezentarea este factorul determinant.

Utilizările terapeutică și diagnostică împotriva cancerelor suplimentare sunt prezentate în următoarea descriere mai detaliată a proteinelor (polipeptidelor) care stau la baza peptidelor în conformitate cu descrierea.

Proteina NKD1 este redusă, însă ARNm-ul NKD1 este crescut în cancerul pulmonar non-microcelular, prima fiind corelată cu un potențial invaziv crescut și un prognostic slab (Zhang et al., 2011). S-a constatat, de asemenea, că ARNm-ul NKD1 este ridicat în celulele din tumorile de colon umane (Yan et al., 2001; Zhang et al., 2011).

O peptidă constând sau constând în esență din secvența de aminoacizi indicată aici poate avea unul sau doi aminoacizi neancorați (vezi mai jos în ceea ce privește motivul de ancoră) schimbați fără ca această capacitate de a se lega la o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II să fie modificată substanțial sau să fie

afectată negativ în comparație cu peptida nemodificată. Într-un alt exemplu, într-o peptidă care constă în esență din secvența de aminoacizi indicată în prezentul document, unul sau doi aminoacizi pot fi schimbați cu partenerii lor de schimb conservatori (vezi aici mai jos), fără ca această capacitate de a se lega la o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II să fie modificată substanțial sau este afectată negativ în comparație cu peptida nemodificată.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o peptidă în conformitate cu prezentul document, în care respectiva peptidă este modificată și/sau include legături non-peptidice.

Prezenta descoperire se referă suplimentar la o peptidă în conformitate cu prezenta descriere, în care respectiva peptidă face parte dintr-o proteină de fuziune, în special fuzionată cu aminoacizi N-terminali ai lanțului invariant (Ii) asociat cu antigenul HLA-DR sau fuzionată cu un anticorp (sau în secvența unui anticorp), cum ar fi, de exemplu, un anticorp care este specific pentru celulele dendritice, adică se leagă de celulele dendritice.

Prezenta descoperire se referă în continuare la un acid nucleic care codifică o peptidă descrisă în prezentul document. Prezenta descoperire referă în continuare la acidul nucleic descris în prezentul document, care este ADN, ADNc, APN, ARN sau combinații ale acestora.

Prezenta descoperire se referă în continuare la un vector de exprimare care este capabil să exprime, exprimă și/sau prezintă un acid nucleic așa cum este descris în prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o peptidă în conformitate cu descrierea din prezentul document, un acid nucleic în conformitate cu descrierea din prezentul document sau un vector de exprimare în conformitate cu descrierea din prezentul document pentru utilizare în medicină.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la anticorpii descriși mai în detaliu mai jos și metodele pentru realizarea lor. Preferați sunt anticorpii care sunt specifici pentru peptidele prezentei descrieri și/sau pentru peptidele prezentei descrieri atunci când sunt legate de MHC-ul lor. Anticorpii preferați pot fi monoclonali.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la receptori de celule T (TCR), în particular receptori de celule T solubili (sTCR), care vizează peptidele descrise în prezentul document și/sau complexe peptidă-MHC ale acestora, precum și metodele pentru

realizarea lor.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la anticorpi sau alte molecule de legare care vizează peptidele descrise în prezentul document și/sau complexe peptidă-MHC ale acestora, precum și metodele pentru realizarea lor.

Prezenta descriere se referă în continuare la o celulă gazdă cuprinzând un acid nucleic în conformitate cu descrierea din prezentul document sau un vector de exprimare descris anterior. Prezenta descoperire se referă în continuare la celula-gazdă descrisă în prezentul document care este o celulă prezentatoare de antigen. Prezenta descoperire se referă în continuare la celula-gazdă descrisă în prezentul document în care celula prezentatoare de antigen este o celulă dendritică.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o metodă de producere a unei peptide în conformitate cu descrierea din prezentul document, metoda cuprinzând cultivarea celulei gazdă în conformitate cu descrierea din prezentul document și izolarea peptidei din celula-gazdă și/sau din mediul său de cultură.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o metodă *in vitro* pentru producerea de celule T activate, metoda cuprinzând contactul *in vitro* al celulelor T cu molecule II MHC de clasă I umane încărcate cu antigen exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate pentru o perioadă de timp suficientă pentru activarea celulelor T menționate într-un mod specific antigenului, respectivul antigen fiind cel puțin o peptidă în conformitate cu prezenta invenție. Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o metodă în care antigenul este încărcat pe molecule de II MHC de clasă I sau II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen.

Prezenta descoperire se referă în continuare la metoda descrisă în prezentul document în care celula prezentatoare de antigen cuprinde un vector de exprimare capabil să exprime respectiva peptidă care conține SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă de secvență aminoacidică a acesteia.

Prezenta descoperire se referă în continuare la celulele T activate produse prin metoda în conformitate cu descrierea din prezentul document care recunosc selectiv o celulă care exprimă aberant o polipeptidă cuprinzând o secvență de aminoacizi în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o metodă de ucidere a celulelor-țintă la un pacient la care celulele țintă exprimă aberant o polipeptidă cuprinzând orice secvență de aminoacizi în conformitate cu descrierea din prezentul document, metoda cuprinzând administrarea, la pacient, a unui număr eficace de celule T în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la utilizarea oricărei peptide descrise, a unui acid nucleic în conformitate cu descrierea din prezentul document, a unui vector de exprimare în conformitate cu descrierea din prezentul document, a unei celule în conformitate cu descrierea din prezentul document sau a unei celule T activate în conformitate cu descrierea din prezentul document ca medicament sau în fabricarea unui medicament.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu descrierea din prezentul document în care respectivul medicament este un vaccin, o celulă, o populație de celule, cum ar fi, de exemplu, o linie celulară, sTCR-uri și anticorpi monoclonali.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu descrierea din prezentul document în care medicamentul este activ împotriva cancerului.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu descrierea din prezentul document în care respectivele celule canceroase sunt celule de HCC.

Prezenta descoperire se referă în continuare la proteine marker și biomarkeri particali pe baza peptidelor din prezenta invenție care pot fi utilizate în diagnosticarea și/sau prognosticul HCC.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la utilizarea acestor ținte noi pentru tratarea cancerului.

În plus, prezenta descoperire se referă la o metodă de producere a unui vaccin anticancer personalizat pentru un pacient individual folosindu-se o bază de date (descrisă în prezentul document și ca „depozit”) de peptide asociate cu tumori preselectate.

Stimularea unui răspuns imunitar depinde de prezența unor antigeni recunoscuți ca străini de către sistemul imunitar al gazdei. Descoperirea antigenilor asociați tumorilor a creat posibilitatea de a folosi sistemul imunitar al gazdei pentru a interveni asupra creșterii tumorale. În prezent, imunoterapia cancerului explorează diferite mecanisme de

valorificare a ambelor componente, umorală și celulară, ale sistemului imunitar.

Elemente specifice ale răspunsului imunitar celular sunt capabile de a recunoaște și distruge în mod specific celulele tumorale. Izolarea celulelor T din populațiile celulare care infiltrează tumorile sau din sângele periferic sugerează că aceste celule au un rol important în reacția imunitară naturală împotriva cancerului. În special celulele T CD8-pozitive capabile să recunoască moleculele de clasă I ale peptidelor purtătoare ale complexului major de histocompatibilitate (MHC), care includ, de obicei, 8 până la 10 resturi de aminoacizi derivate din proteine sau produse ribozomale defectuoase (DRIP) localizați în citozol, joacă un rol important în acest răspuns. Moleculele MHC umane sunt desemnate și ca antigeni leucocitari umani (HLA).

Termenul „peptidă” este folosit în prezentul document pentru a desemna o serie de resturi aminoacid conectate între ele de obicei prin punți peptidice între grupările alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Peptidele au, preferabil, o lungime de 9 aminoacizi, dar pot avea lungimea de 8 aminoacizi și până la 10, 11, 12 sau 13 aminoacizi și, în cazul peptidelor MHC de clasă II (variante alungite ale peptidelor din descoperire), pot avea o lungime de 15, 16, 17, 18, 19 sau 20 de aminoacizi.

Mai mult, termenul „peptidă” va include săruri ale unei serii de resturi aminoacid conectate între ele, de obicei, prin punți peptidice între grupările alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. De preferință, sărurile sunt săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic ale peptidelor, cum ar fi, de exemplu, sărurile de clorură sau acetat (trifluoroacetat). Trebuie menționat că sărurile peptidelor în conformitate cu prezenta descriere diferă în mod substanțial de peptidele în starea lor *in vivo*, întrucât peptidele nu sunt săruri *in vivo*.

Termenul „peptidă” include, de asemenea, „oligopeptidă”. Termenul „oligopeptidă” este folosit în prezentul document pentru a desemna o serie de resturi aminoacid conectate între ele de obicei prin punți peptidice între grupările alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Lungimea oligopeptidei nu este critică pentru invenție atât timp cât epitopul corect (sau epitopii corecți) se includ în aceasta. Oligopeptidele au, de obicei, o lungime mai mică de 30 de aminoacizi, dar mai mare de 15 aminoacizi.

Termenul „peptidele din prezenta invenție” va include, de asemenea, peptidele care constau din sau conțin o peptidă definită mai sus în conformitate cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300.

Termenul „polipeptidă” desemnează o serie de resturi aminoacid conectate între ele de obicei prin punți peptidice între grupările alfa-amino și –carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Lungimea polipeptidei nu este critică pentru invenție atâta timp cât sau epitopii corecți se păstrează. Spre deosebire de termenii „peptidă” sau „oligopeptidă”, termenul „polipeptidă” se referă la molecule care conțin mai mult de circa 30 de resturi de aminoacid.

O peptidă, oligopeptidă, proteină sau polinucleotidă care codifică o astfel de moleculă este „imunogenă” (desemnată prin termenul „imunogen” în prezenta invenție) dacă este capabilă să inducă un răspuns imunitar. În cazul prezentei invenții, imunogenitatea este definită mai specific ca fiind abilitatea de a induce un răspuns mediat de celulele T. Astfel, o „imunogenă” este o moleculă capabilă să inducă un răspuns imunitar și, în cazul prezentei invenții, o moleculă capabilă să inducă un răspuns al celulelor T. Într-un alt aspect, imunogenul poate fi peptida, complexul peptidei cu MHC, oligopeptida și/sau proteina care este utilizată pentru a ridica anticorpi sau TCR-uri specifice împotriva acesteia.

Un „epitop” al celulei T de clasă I necesită o peptidă scurtă care se leagă de receptorul MHC de clasă I formând un complex ternar (catenă alfa MCH de clasă I, beta-2-microglobulină și peptidă) care poate fi recunoscut de o celulă T care poartă un receptor de celulă T corespunzător care se leagă de complexul MHC/peptidă cu afinitatea adecvată. Peptidele care se leagă de molecule MHC de clasă I au de obicei o lungime de 8-14 aminoacizi, cel mai frecvent având lungimea de 9 aminoacizi.

La oameni există trei loci genetici diferiți care codifică moleculele MHC de clasă I (moleculele MHC ale omului sunt și antigeni leucocitari umani desemnați (HLA)): HLA-A, HLA-B și HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, și HLA-B*07 sunt exemple de diferite alele MHC de clasă I care pot fi exprimate din acești loci.

Tabelul 4: Frecvențele de exprimare F pentru HLA*A02 și HLA-A*24 și cele mai frecvente serotipuri HLA-DR. Frecvențele sunt deduse din frecvențele haplotipurilor Gf din populația americană adaptate din Mori et al. (Mori M et al., HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997 Oct 15; 64(7): 1017-27) folosind formula Hardy-Weinberg: $F=1-(1-Gf)^2$. Combinațiile de A*02 sau A*24 cu anumite alele HLA-DR pot fi îmbogățite sau mai puțin frecvente decât s-a estimat pe baza frecvențelor singulare datorită unor dezechilibre de legare. Pentru detalii, vezi Chanock et al. (S.J. Chanock, et al. (2004) HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and DRB1 in an African American population from Bethesda, USA Human Immunology, 65: 1223-1235).

Alelă	Populație	Fenotip calculat din frecvența alelei
A*02	Caucasiană (America de Nord)	49,1%
A*02	Afro-americană (America de Nord)	34,1%
A*02	Asiatic-americană (America de Nord)	43,2%
A*02	Latino-americană (America de Nord)	48,3%
DR1	Caucasiană (America de Nord)	19,4%
DR2	Caucasiană (America de Nord)	28,2%
DR3	Caucasiană (America de Nord)	20,6%
DR4	Caucasiană (America de Nord)	30,7%
DR5	Caucasiană (America de Nord)	23,3%
DR6	Caucasiană (America de Nord)	26,7%
DR7	Caucasiană (America de Nord)	24,8%
DR8	Caucasiană (America de Nord)	5,7%
DR9	Caucasiană (America de Nord)	2,1%
DR1	Afro-(nord)-americană	13,20%
DR2	Afro-(nord)-americană	29,80%
DR3	Afro-(nord)-americană	24,80%
DR4	Afro-(nord)-americană	11,10%
DR5	Afro-(nord)-americană	31,10%
DR6	Afro-(nord)-americană	33,70%
DR7	Afro-(nord)-americană	19,20%
DR8	Afro-(nord)-americană	12,10%
DR9	Afro-(nord)-americană	5,80%
DR1	Afro-(nord)-americană	6,80%
DR2	Afro-(nord)-americană	33,80%
DR3	Afro-(nord)-americană	9,20%
DR4	Afro-(nord)-americană	28,60%
DR5	Afro-(nord)-americană	30,00%
DR6	Afro-(nord)-americană	25,10%
DR7	Afro-(nord)-americană	13,40%
DR8	Afro-(nord)-americană	12,70%
DR9	Afro-(nord)-americană	18,60%
DR1	Latino-(nord)-americană	15,30%
DR2	Latino-(nord)-americană	21,20%
DR3	Latino-(nord)-americană	15,20%
DR4	Latino-(nord)-americană	36,80%
DR5	Latino-(nord)-americană	20,00%
DR6	Latino-(nord)-americană	31,10%
DR7	Latino-(nord)-americană	20,20%
DR8	Latino-(nord)-americană	18,60%
DR9	Latino-(nord)-americană	2,10%
A*24	Filipine	65%

Alelă	Populație	Fenotip calculat din frecvența alelei
A*24	Neneția, Rusia	61%
A*24:02	Japonia	59%
A*24	Malaysia	58%
A*24:02	Filipine	54%
A*24	India	47%
A*24	Coreea de Sud	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia de Vest	22%
A*24	SUA	22%
A*24	Samara, Rusia	20%
A*24	America de Sud	20%
A*24	Europa	18%

Peptidele din descoperire, de preferință atunci când sunt incluse într-un vaccin al descoperirii, așa cum este descris aici, se leagă de A*02 sau A*24. Un vaccin poate include, de asemenea, peptide MHC de clasă II. Prin urmare, vaccinul în conformitate cu descoperirea poate fi utilizat pentru tratarea cancerului la pacienți care sunt A*02 pozitivi, A*24 pozitivi sau pozitivi pentru A*02 și A*24 întrucât nu este necesară nicio selecție pentru alotipurile MHC de clasă II din cauza pan-legării acestor peptide.

Combinarea, de exemplu, a peptidelor A*02 și A*24 într-un singur vaccin are avantajul că un procentaj mai mare din orice populație de pacienți poate fi tratat în comparație cu abordarea fiecărei alele MHC de clasă I singulare. În timp ce, în majoritatea populațiilor, mai puțin de 50% dintre pacienți pot fi abordați de o alelă singulară, vaccinul din descoperire poate trata cel puțin 60% dintre pacienți din orice populație relevantă. În mod specific, următoarele procentaje de pacienți vor fi pozitive pentru cel puțin una dintre aceste alele în diferite regiuni: SUA 61%, Europa de Vest 62%, China 75%, Coreea de Sud 77%, Japonia 86% (calculare de pe www.allelefrequencies.net).

Așa cum este utilizată aici, referirea la o secvență ADN include atât ADN monocatenar, cât și dublu-catenar. Astfel, secvența specifică, dacă contextul nu indică altminteri, se referă la monocatena ADN a secvenței respective, la duplexul respectivei secvențe cu complementul ei (ADN dublu catenar) și la complementul secvenței respective. Termenul „regiune de codare” se referă la acea porțiune a genei care codifică, fie în mod natural, fie în mod normal, produsul de exprimare al acelei gene în mediul său genomic natural, adică

regiunea care codifică *in vivo* produsul de exprimare nativ al genei respective.

Regiunea de codificare poate fi derivată dintr-o genă non-mutantă („normală”), mutantă sau alterată ori poate fi derivată chiar dintr-o secvență ADN sau o genă sintetizată în întregime în laborator folosindu-se metode bine cunoscute profesioniștilor din domeniul sintezelor ADN.

Într-o concretizare preferată, termenul „secvență nucleotidică” se referă la un heteropolimer al dezoxiribonucleotidelor.

Secvența nucleotidică ce codifică o anumită peptidă, oligopeptidă sau polipeptidă poate fi întâlnită în mod natural sau poate fi construită artificial. În general, segmentele ADN care codifică peptidele, polipeptidele și proteinele care fac subiectul acestei descoperiri sunt asamblate pornind de la fragmente ADNc și liganzi scurți oligonucleotidici sau de la serii de oligonucleotide, care asigură o genă sintetică capabilă de a fi exprimată într-o unitate de transcriere recombinantă care conține elemente reglatoare derivate dintr-un operon microbial sau viral.

Așa cum se utilizează aici, termenul „o codificare (sau codare) cu nucleotide pentru o peptidă” se referă la o codificare cu o secvență de nucleotide pentru peptidă care include coduri de start și stop artificiale (făcute de om) compatibile pentru sistemul biologic pentru care secvența urmează să fie exprimată, de exemplu, o celulă dendritică sau un alt sistem celular util pentru producerea de TCR.

Termenul „produs de exprimare” se referă la polipeptida sau proteina care reprezintă produsul natural de translație al genei și orice echivalenți de codificare a secvenței de acid nucleic rezultați din degenerarea codului genetic care, astfel, codifică aceiași aminoacizi.

Termenul „fragment”, atunci când se referă la o secvență de codificare, înseamnă o porțiune de ADN care conține mai puțin decât regiunea completă de codificare, al cărei produs complet de exprimare reține, în principal, aceeași funcție sau activitate biologică ca și produsul de exprimare al întregii regiuni de codificare.

Termenul „segment ADN” se referă la un polimer ADN, sub forma unui fragment separat sau ca o componentă a unei construcții ADN mai mari, care a fost obținută din ADN izolat cel puțin o dată în formă substanțială pură, adică fără contaminanți endogeni și în cantități sau concentrații care permit identificarea, manipularea și recuperarea segmentului și a secvențelor nucleotidice componente prin metode biochimice standard, de exemplu prin

utilizarea unui vector de clonare. Aceste segmente sunt furnizate sub forma unui cadru deschis de citire, neîntrerupt de secvențe interne netraduse (sau introni) care sunt de obicei prezente în genele eucariote. Secvențele de ADN netradus pot fi prezente în aval de cadrul de citire deschis, unde acestea nu interferează cu manipularea sau exprimarea regiunilor de codificare.

Termenul „amorsă” se referă la o secvență de acid nucleic scurtă care se poate împerechea cu o monocatenă ADN și care asigură un capăt 3'-OH liber la nivelul căruia ADN polimeraza începe sinteza unei catene de dezoxiribonucleotide.

Termenul „promotor” se referă la o regiune ADN implicată în legarea ARN-polimerazei pentru a iniția transcrierea.

Termenul „izolat” se referă la faptul că materialul este îndepărtat din mediul său original (de exemplu, mediul natural, dacă apare în mod natural). De exemplu, o polinucleotidă sau polipeptidă care apare natural într-un animal viu nu este izolată; dar aceeași polinucleotidă sau polipeptidă separată de una sau toate materialele coexistente din sistemul natural reprezintă un izolat. Aceste polinucleotide pot face parte dintr-un vector și/sau aceste polinucleotide sau polipeptide pot face parte dintr-un compus, dar rămânând izolate deoarece vectorul sau compusul nu face parte din mediul natural.

Polinucleotidele și polipeptidele recombinante sau imunogene, dezvăluite în conformitate cu prezenta descoperire, pot să fie în formă „purificată”. Termenul „purificat” nu se referă la puritate absolută; mai degrabă este intenționat ca definiție relativă, și poate include produse care sunt înalt purificate sau produse care sunt numai parțial purificate, deoarece acești termeni sunt înțeleși de cei instruiți în domeniul relevant. Pentru exemplificare, clonele individuale izolate dintr-o bibliotecă de ADNc au fost purificate în mod convențional până la omogenitate electroforetică. Purificarea materialelor de început sau naturale până la cel puțin un ordin de mărime, preferabil la două sau trei ordine de mărime, și ideal la patru sau cinci ordine de mărime este de dorit în special. Mai mult, este avută în vedere în mod special o polipeptidă revendicată care are o puritate de, preferabil, 99,999%, sau cel puțin 99,99% sau 99,9%; sau chiar și 99% ca greutate sau mai mare.

Produsele de exprimare a acizilor nucleici și polipeptidelor descrise în conformitate cu prezenta descoperire, precum și vectorii de exprimare care conțin acești acizi nucleici și/sau aceste polipeptide pot fi în „formă îmbogățită”. În accepțiunea documentului, termenul „îmbogățit” se referă la faptul că materialul respectiv este în concentrație de cel

puțin 2, 5, 10, 100 sau 1000 de ori mai mare decât concentrația sa naturală (de exemplu), mai avantajos 0,01% masic, preferabil cel puțin 0,1% masic. Produsele îmbogățite cu 0,5%, 1%, 5%, 10% și 20% masic sunt de asemenea de interes. Secvențele, compușii, vectorii, clonele și celelalte materiale care sunt cuprinse în prezenta descoperire pot fi, în funcție de interes, în formă îmbogățită sau izolată.

Termenul „fragment activ” se referă la un fragment, de obicei o peptidă, o polipeptidă sau o secvență de acid nucleic, care generează un răspuns imunitar (adică, are activitate imunogenă) la administrare, singur sau, opțional, alături de un adjuvant adecvat, unui animal, cum ar fi de exemplu un mamifer, ca de exemplu un iepure sau cobai, dar care include și un om, răspunsul imunitar putând lua forma unui răspuns de stimulare a celulelor T în cadrul animalului primitor, cum ar fi omul. Alternativ, termenul „fragment activ” se poate folosi pentru inducerea unui răspuns celular T *in vitro*.

În accepțiunea prezentului document, termenii „porțiune”, „segment” și „fragment”, atunci când sunt folosiți în raport cu polipeptidele, se referă la o secvență continuă de resturi, cum ar fi resturi de aminoacid, care secvență formează un subset al unei secvențe mai mari. De exemplu, dacă o polipeptidă este supusă unui tratament cu oricare dintre endopeptidazele uzuale, cum ar fi tripsina sau chimotripsina, oligopeptidele care rezultă din acest tratament reprezintă porțiuni, segmente sau fragmente ale polipeptidei inițiale. Atunci când sunt folosiți în raport cu polinucleotidele, acești termeni se referă la produse obținute prin tratarea polinucleotidelor respective cu oricare dintre endonucleazele uzuale.

În accepțiunea prezentei descoperiri, termenul „omologie procentuală”, „identitate procentuală” sau „procentaj identic”, cu referire la o secvență, presupune că o secvență este comparată cu o secvență patentată sau descrisă după alinierea secvenței care se compară („secvența comparată”) cu secvența descrisă sau patentată („secvență de referință”). Identitatea procentuală se determină conform următoarelor formule:

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

unde C este numărul de diferențe dintre secvența de referință și secvența comparată pe lungimea aliniamentului dintre secvența de referință și cea comparată, în care

- (i) fiecare bază sau aminoacid din secvența de referință care nu are un corespondent aliniat, bază sau aminoacid, în secvența comparată și
- (ii) fiecare lipsă din secvența de referință și

(iii) fiecare bază sau aminoacid aliniat(ă) din secvența de referință care diferă de baza sau aminoacidul aliniat din secvența comparată, reprezintă diferențe și (iiii) alinierea trebuie să înceapă la poziția 1 a secvențelor aliniate;

și R este numărul de baze sau aminoacizi din secvența de referință pe lungimea alinierii cu secvența comparată, orice lipsă apărută în secvența de referință fiind de asemenea numărată ca bază sau aminoacid.

Dacă există un aliniament între secvența comparată și secvența de referință pentru care identitatea procentuală calculată anterior este aproximativ egală cu, sau mai mare decât o identitate procentuală minimă specificată, atunci secvența comparată are o identitate procentuală minimă specificată cu secvența de referință, deși pot exista aliniamente pentru care anterior-menționata identitate procentuală să fie mai mică decât identitatea procentuală specificată.

Peptidele originale (nemodificate) în conformitate cu descrierea din prezentul document se pot modifica prin substituirea unuia sau a mai multor resturi din diferite poziții diferite, posibil selectate, din structura catenei peptidice, dacă nu s-a specificat altfel. Preferabil, aceste substituții sunt localizate la capătul catenei de aminoacizi. Astfel de substituții pot fi conservatoare, de exemplu, dacă un aminoacid este substituit cu un alt aminoacid cu structură și caracteristici similare, astfel încât de exemplu un aminoacid hidrofob să fie înlocuit cu un alt aminoacid hidrofob. Mult mai conservatoare ar fi înlocuirea aminoacizilor cu unii de dimensiune și natură chimică identică sau similară, cum ar fi în cazul în care leucina este înlocuită de izoleucină. În studiile variațiilor de secvențe la familii cu proteine omologe natural-survenite, anumite substituții aminoacidice sunt mai frecvent tolerate decât altele, aceasta corelându-se cu similitudinile de dimensiune, sarcină, polaritate și hidrofobicitate dintre aminoacidul natural și cel care îl înlocuiește, aceasta fiind baza de definire a „substituțiilor conservatoare”.

Substituțiile conservatoare sunt în prezentul document definite ca schimburi în cadrul unuia dintre următoarele cinci grupuri: Grupul 1 – resturi mici, alifactice, nepolare sau ușor polare (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Grupul 2 – resturi polare, încărcate negativ și amidele lor (Asp, Asn, Glu, Gln); Grupul 3 – resturi polare, încărcate pozitiv (His, Arg, Lys); Grupul 4 – resturi mari, alifactice, nepolare (Met, Leu, Ile, Val, Cys); și Grupul 5 – resturi mari, aromatice (Phe, Tyr, Trp).

Substituțiile mai puțin conservatoare pot implica schimbarea unui aminoacid cu un altul

cu caracteristici similare dar oarecum diferit ca dimensiuni, cum ar fi de exemplu substituirea alaninei cu un rest de izoleucină. Substituțiile înalt non-conservatoare pot implica substituirea unui aminoacid acid cu unul care este polar sau chiar bazic. Astfel de substituții „radicale” nu pot fi apreciate, totuși, ca potențial ineficiente deoarece efectele chimice nu sunt complet previzibile; astfel de substituții radicale pot provoca efecte caracterizate de serendipitate, fiind impredictibile pe baza principiilor chimice elementare.

Desigur, aceste substituții pot implica structuri diferite de L-aminoacizii uzuali. Astfel, D-aminoacizii se pot substitui cu L-aminoacizii identificați uzual în peptidele antigenice ale descoperirii, fiind în continuare incluși în prezentul document. În plus, aminoacizii care prezintă grupări R non-standard (adică, grupări R diferite de cele identificate în cei 20 aminoacizi uzuali din proteinele naturale) pot fi folosiți în scopuri de substituție pentru a produce imunogene și polipeptide imunogene conform prezentei descoperiri.

Dacă substituțiile din mai mult de o poziție se descoperă că pot conduce la o peptidă cu activitate antigenică substanțial echivalentă sau mai mare decât cea descrisă mai jos, atunci aceste substituții se vor testa pentru a identifica dacă substituțiile combinate provoacă efecte cumulative sau sinergice ale antigenicității peptidei. În cel mai rău caz, nu se pot substitui simultan mai mult de 4 poziții din cadrul peptidei.

Peptidele din descoperire pot fi alungite cu până la patru aminoacizi, adică 1, 2, 3 sau 4 aminoacizi pot fi adăugați la orice capăt în orice combinație între 4:0 și 0:4.

Combinațiile alungirilor în conformitate cu descoperirea pot fi ilustrate din Tabelul 5:

C-terminus	N-terminus
4	0
3	0 sau 1
2	0 sau 1 sau 2
1	0 sau 1 sau 2 sau 3
0	0 sau 1 sau 2 sau 3 sau 4
N-terminus	C-terminus
4	0
3	0 sau 1
2	0 sau 1 sau 2
1	0 sau 1 sau 2 sau 3
0	0 sau 1 sau 2 sau 3 sau 4

Aminoacizii pentru alungire/extindere pot fi peptidele secvenței inițiale a proteinei sau a oricărui alt aminoacid S. Alungirea poate fi utilizată pentru a spori stabilitatea sau

solubilitatea peptidelor.

Termenul „răspuns celular T” se referă la proliferarea și activarea specifică a funcțiilor efectoare induse de o peptidă, *in vitro* sau *in vivo*. Pentru CTL limitate la MHC de clasă I, funcțiile efectoare pot fi de liză a celulelor țintă cu peptide pulsate, precursori de peptide pulsate sau care prezintă peptide naturale, de secreție de citokine, preferabil interferon gamma, TNF-alfa sau IL-2 indusă de peptide, secreție de molecule efectoare, preferabil granzime sau perforine induse de peptidă, sau degranulare.

De preferat, atunci când celulele T specifice pentru o peptidă descrisă față de peptide substitute, concentrația de peptide la care peptidele substitute ating jumătate din creșterea maximă a lizei comparativ cu fundalul este mai mică de 1mM, preferabil nu depășește 1 μM, și mai preferabil nu depășește 1 nM, cel mai preferabil nu depășește 100 pM și în mod ideal nu depășește 10 pM. Este de asemenea de preferat ca peptida substituită să fie recunoscută de celule T provenind de la mai mulți indivizi, preferabil doi, dar, și mai preferabil, trei indivizi.

Astfel, epitopii din prezenta descoperire pot fi identici cu cei care apar natural asociați tumorii sau specifici tumorii, sau pot include epitopi care diferă prin cel mult patru resturi de peptida de referință, atâta timp cât au activitate antigenică substanțial identică.

Moleculele MHC de clasă I pot fi găsite pe majoritatea celulelor nucleate care prezintă peptide rezultate din scindarea proteolitică a proteinelor care sunt în principal endogene, provenite din citosol sau nucleare, și DRIP, dar și a peptidelor mai mari. Totuși, proteinele derivate din compartimentele endozomale sau surse exogene se regăsesc frecvent pe moleculele MHC de clasă I. Această modalitate non-clasică de prezentare a clasei I este cunoscută în literatură ca „prezentare încrucișată”.

Deoarece ambele tipuri de răspuns, CD8-dependente și CD4-dependente, contribuie împreună și sinergic la efectul antitumoral, identificarea și caracterizarea antigenelor asociate tumorii recunoscute de celule T CD8-pozitive (molecule MHC de clasă I) sau de celule T CD4-pozitive (molecule MHC de clasă II) este importantă pentru dezvoltarea unor vaccinuri antitumorale. Face, prin urmare, obiectul prezentei descoperiri furnizarea de compoziții ale peptidelor care conțin peptide care se leagă de complexe MHC indiferent de clasa acestora.

Considerând efectele secundare severe și cheltuielile asociate cu tratarea cancerului este nevoie disperată de metode îmbunătățite de diagnostic și prognostic mai bun. Prin urmare

este necesară identificarea altor factori care reprezintă biomarkeri pentru cancer în general și pentru HCC în special. Mai mult, este necesară identificarea unor factori care se pot folosi pentru tratamentul cancerului în general și pentru HCC în special.

Prezenta descoperire furnizează peptide care sunt utile în tratarea cancerelor/tumorilor, de preferință HCC, care supraprezintă sau prezintă exclusiv peptidele din descoperire. Aceste peptide sunt ilustrate prin spectrometrie de masă pentru a fi prezentate în mod natural de către moleculele HLA pe probe primare umane de HCC.

S-a constatat că gena-/proteina-sursă (denumită, de asemenea, „proteină de lungime completă” sau „proteină subiacentă”) din care se derivă peptidele este foarte supraexprimată în cancer comparativ cu țesuturile normale – „țesuturi normale”, în raport cu prezenta descoperire, înseamnă celule hepatice sănătoase sau alte celule tisulare normale care demonstrează un grad ridicat de asociere tumorală a genelor-sursă (vezi Exemplul 2). Mai mult, peptidele în sine sunt puternic supraprezentate pe țesutul tumoral – „țesut tumoral”, în raport cu această descoperire, înseamnă o probă de la un pacient care suferă de HCC, însă nu și pe țesuturi normale (vezi Exemplul 1).

Peptidele legate de HLA se pot recunoaște de către sistemul imunitar, în special de limfocite T. Celulele T pot distruge celulele care prezintă complexul HLA-peptidă recunoscut, de exemplu celulele HCC care prezintă peptidele derivate.

Peptidele din prezenta descoperire s-au dovedit a fi capabile să stimuleze răspunsurile celulelor T și/sau sunt supraprezentate și astfel pot fi utilizate pentru producerea de anticorpi și/sau TCR-uri, în particular sTCR-uri, conform prezentei descoperiri (vezi Exemplul 3). Mai mult, complexul format de peptide cu MHC-ul respectiv poate fi folosit și pentru producția de anticorpi specifici și/sau TCR-uri, în particular sTCR-uri, în conformitate cu descrierea din prezentul document. Metodele respective sunt bine cunoscute de experții în domeniu și pot fi găsite și în literatura de specialitate respectivă. Astfel, peptidele din prezenta descoperire sunt utile pentru generarea unui răspuns imunitar la un pacient, prin care celulele tumorale pot fi distruse. Răspunsul imun la pacient poate fi indus prin administrarea directă a peptidelor descrise sau a substanțelor precursorare adecvate (de exemplu peptide elongate, proteine sau acizi nucleici care codifică aceste peptide) la pacient, în mod ideal combinate cu un agent care crește imunogenitatea (de exemplu un adjuvant). Răspunsul imunitar care are originea în astfel de vaccinare terapeutică se poate aștepta să fie foarte specific împotriva celulelor tumorale deoarece peptidele țintă ale prezentei descoperiri nu sunt prezente pe țesuturi normale în numere de

copii comparabile, fapt care previne riscul unor reacții autoimune nedorite îndreptat împotriva celulelor normale ale pacientului.

O „compoziție farmaceutică” este, preferabil, o compoziție potrivită pentru administrarea la o ființă umană într-un cadru medical. De preferință, o compoziție farmaceutică este sterilă și produsă conform recomandărilor GMP.

Compozițiile farmaceutice conțin peptidele fie în forma liberă fie sub forma unei săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic (vezi mai sus). În accepțiunea prezentului document, „sare acceptabilă (din punct de vedere) farmaceutic” se referă la un derivat al peptidei menționate în care peptida este modificată prin formarea de săruri acide sau bazice ale agentului. De exemplu, sărurile acide sunt preparate din baza liberă (de obicei, în forma neutră, medicamentul are un grup $-NH_2$ neutru) implicând reacția cu un acid adecvat. Acizii adecvați pentru pregătirea sărurilor acide includ atât acizi organici (de exemplu acid acetic, acid propionic, acid glicolic, acid piruvic, acid oxalic, acid malic, acid malonic, acid succinic, acid maleic, acid fumaric, acid tartaric, acid citric, acid benzoic, acid cinamic, acid mandelic, acid metansulfonic, acid etansulfonic, acid p-toluensulfonic, acid salicilic și alții asemenea lor), cât și acizi anorganici, cum ar fi acidul clorhidric, acidul bromhidric, acidul sulfuric, acidul azotic, acidul fosforic și alții asemenea lor. Dimpotrivă, preparatele sărurilor bazice ale grupărilor acide care pot face parte din peptidă sunt preparate folosind o bază acceptabilă farmaceutic, cum ar fi hidroxidul de sodiu, hidroxidul de potasiu, hidroxidul de amoniu, hidroxidul de calciu, trimetilamina sau altele asemenea.

Într-o concretizare preferată în mod special, compusul farmaceutic cuprinde peptidele sub forma unor săruri de acid acetic (acetați), trifluor-acetați sau săruri de acid clorhidric (cloruri).

Se preferă, în special, o compoziție și/sau utilizarea acesteia, de exemplu sub formă de vaccin.

Peptida din prezenta descoperire se poate folosi pentru a genera și a dezvolta anticorpi specifici contra complexelor MHC/peptidă. Acestea se pot folosi pentru tratament, direcționarea toxinelor sau substanțelor radioactive către țesutul bolnav. O altă utilizare a acestor anticorpi poate fi țintirea radionuclizilor către țesutul bolnav în scopuri imagistice, cum ar fi PET. Această utilizare poate ajuta la depistarea metastazelor mici sau pentru stabilirea dimensiunii și localizării exacte a țesutului bolnav.

Prin urmare, un alt aspect al invenției este furnizarea unei metode pentru producerea unui

anticorp recombinant care se leagă în mod specific la un complex major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I sau II uman care este complexat cu un antigen HLA-restricționat, metoda cuprinzând: imunizarea unui mamifer non-uman modificat genetic care cuprinde celule care exprimă respectivul complex major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I sau II uman cu o formă solubilă a moleculei MHC de clasă I sau II complexate cu respectivul antigen HLA-restricționat; izolarea moleculelor ARNm din celulele producătoare de anticorp ale respectivului mamifer non-uman; producerea unei biblioteci de prezentare a fagilor care prezintă molecule de proteină codificate de respectivele molecule ARNm; și izolarea cel puțin a unui fag din respectiva bibliotecă de prezentare a fagilor, cel puțin un fag care prezintă anticorpul respectiv cu legare specifică la complexul major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I sau II uman complexat cu antigenul HLA-restricționat menționat.

Un alt aspect al invenției este acela de a furniza un anticorp care se leagă în mod specific la un complex major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I sau II care este complexat cu un antigen restricționat HLA, în care anticorpul este, de preferință, un anticorp policlonal, un anticorp monoclonal, un anticorp bi-specific și/sau un anticorp himeric.

Un alt aspect al prezentei invenții se referă, deci, la o metodă de producere a anticorpului respectiv care se leagă în mod specific la un complex major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I uman care este complexat cu un antigen HLA-restricționat, metoda cuprinzând: imunizarea unui mamifer non-uman modificat genetic care cuprinde celule care exprimă respectivul complex major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II cu o formă solubilă a moleculei MHC de clasă I sau II complexată cu respectivul antigen HLA-restricționat; izolarea moleculelor ARNm din celulele producătoare de anticorp ale respectivului mamifer non-uman; producerea unei biblioteci de prezentare a fagilor care prezintă molecule de proteină codificate de respectivele molecule ARNm; și izolarea cel puțin a unui fag din respectiva bibliotecă de prezentare a fagilor, cel puțin un fag care prezintă anticorpul respectiv cu posibilitate de legare specifică la complexul major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II complexat cu antigenul HLA-restricționat menționat. Metodele respective pentru producerea unor astfel de anticorpi și complexe majore de histocompatibilitate de clasă I cu catenă unică, precum și alte instrumente pentru producerea acestor anticorpi sunt descrise în WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 și în publicații (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003).

Preferabil, anticorpul se leagă la complex cu o afinitate de legare mai mică de 20 nanomolari, preferabil sub 10 nanomolari, care este considerată ca fiind „specifică” în contextul prezentei invenții.

Un alt aspect al invenției este acela de a furniza o metodă pentru producerea unui receptor de celule T solubil (sTCR) care să recunoască un complex peptidă-MHC specific. Astfel de receptori de celule T solubili pot fi generați din clone de celule T specifice și afinitatea lor poate fi crescută prin mutageneză care vizează regiunile determinante de complementaritate. În scopul selectării receptorilor de celule T, poate fi utilizat o afișare de fagi (US 2010/0113300, Liddy et al., 2012). În scopul stabilizării receptorilor celulelor T în timpul afișării fagilor și în cazul utilizării practice ca medicament, catena alfa și catena beta pot fi legate, de exemplu, prin legături disulfurice non-native, alte legături covalente (receptor de celulă T cu o singură catenă) sau prin domenii de dimerizare (vezi Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Receptorul de celule T poate fi legat de toxine, medicamente, citokine (vezi, de exemplu, US 2013/0115191), domenii care recrutează celule efectoare precum domeniul anti-CD3, etc. pentru a executa anumite funcții asupra celulelor-țintă. Mai mult, poate fi exprimată în celule T utilizate pentru transferul adoptiv. Informații suplimentare pot fi găsite în WO 2004/033685A1 și WO 2004/074322A1. O combinație de sTCR-uri este descrisă în WO 2012/056407A1. Alte metode pentru producere sunt prezentate în WO 2013/057586A1.

În plus, peptidele și/sau TCR-urile ori anticorpii sau alte molecule de legare din prezenta descoperire pot fi utilizate pentru a verifica diagnosticul de cancer de la un patolog pe baza unei probe biopsiate.

Pentru a selecta peptide supraprezentate, se calculează un profil de prezentare arătând prezentarea mediană a probei, precum și variația replicării. Profilul juxtapune probe ale entității tumorale de interes pentru o linie de bază a probelor de țesut normal. Fiecare dintre aceste profiluri poate fi apoi consolidat într-un scor de supraprezentare, calculându-se valoarea p a unui model liniar cu efecte combinate (Pinheiro et al., 2007), care se ajustează pentru testarea multiplă prin rata de descoperire falsă (Benjamini și Hochberg).

Pentru identificarea și cuantificarea relativă a liganzilor HLA prin spectrometrie de masă, moleculele HLA din probele de țesut înghețat prin șoc au fost purificate și peptidele asociate cu HLA au fost izolate. Peptidele izolate au fost separate și secvențele au fost identificate prin experimente online de nano-electropulverizare-ionizare (nanoESI) prin cromatografie de lichid-spectrometrie de masă (LC-MS). Secvențele peptidice rezultate au

fost verificate prin compararea modelului de fragmentare a TUMAP naturale înregistrate din probe de HCC (N = 16 probe A*02-pozitive, inclusiv 13 probe A*02:01-pozitive, N = 15 probe A*24-pozitive) cu modele de fragmentare ale peptidelor de referință sintetice corespunzătoare ale secvențelor identice. Deoarece peptidele au fost identificate direct ca liganzi ai moleculelor HLA ale tumorilor primare, aceste rezultate furnizează dovezi directe pentru procesarea și prezentarea naturale ale peptidelor identificate pe țesutul canceros primar obținut de la pacienți cu HCC.

Pipeline-ul descoperirii XPRESIDENT® v2.1 (vezi, de exemplu, US 2013-0096016) permite identificarea și selectarea candidaților relevanți pentru vaccinare cu peptide supraprezentate pe baza cuantificării relative directe a nivelurilor de peptide HLA-restricționate pe țesuturile canceroase comparativ cu mai multe țesuturi și organe necanceroase diferite. Acest lucru a fost realizat prin dezvoltarea unei cuantificări diferențiale fără etichete utilizându-se datele LC-MS obținute, procesate de un pipeline patentat de analiză a datelor, combinându-se algoritmi pentru identificarea secvențelor, gruparea spectrală, numărarea ionilor, alinierea timpului de retenție, deconvoluția de stare a încărcării și normalizarea.

Au fost stabilite nivelurile de prezentare, inclusiv estimările de eroare pentru fiecare peptidă și probă. Au fost identificate peptide prezentate exclusiv pe țesuturi tumorale și peptide supraprezentate în tumoră față de țesuturi și organe necanceroase.

Complexele HLA-peptidă din probe de țesut de HCC au fost purificate și peptidele HLA-asociate au fost izolate și analizate prin LC-MS (vezi exemplele). Toate peptidele TUMAP conținute în prezenta aplicație au fost identificate cu această abordare pe probe de HCC primar, confirmându-se prezentarea acestora pe HCC primar.

Peptidele TUMAP identificate pe mai multe tumori de HCC și țesuturi normale au fost cuantificate utilizându-se numărarea de ioni la datelor LC-MS fără etichete. Metoda presupune că zonele de semnal LC-MS ale unei peptide se corelează cu abundența sa în probă. Toate semnalele cantitative ale unei peptide în diferite experimente LC-MS au fost normalizate pe baza tendinței centrale, mediate per probă și fuzionate într-o diagramă de bare, denumită profil de prezentare. Profilul de prezentare consolidează diferite metode de analiză, cum ar fi căutarea în baza de date cu proteine, gruparea spectrală, deconvoluția de stare de încărcare (decompresie) și alinierea și normalizarea timpului de retenție.

Prezenta descoperire se referă la o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din

grupul format din SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă a acesteia care este cel puțin 90% omologă (de preferință identică) cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă a acesteia care induce celule T care reacționează încrucișat cu peptida menționată, în care peptida menționată nu este polipeptida de bază cu lungime completă.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă a acesteia care este cel puțin 90% omologă (de preferință identică) cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300, în care peptida menționată sau varianta acesteia are o lungime totală între 8 și 100, de preferință între 8 și 30 și, cel mai preferat, între 8 și 14 aminoacizi.

Prezenta descoperire se referă și la peptidele în conformitate cu descrierea din prezentul document și care au capacitatea de a se lega la o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau de clasă II.

Prezenta descoperire se referă și la peptidele descrise în prezentul document în care peptidele respective constau sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi în conformitate cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300.

Prezenta invenție se referă în continuare la peptidele descrise în prezentul document, în care peptida este modificată (chimic) modificată și/sau include legături non-peptidice.

Prezenta descoperire se mai referă la peptidele în conformitate cu descrierea din prezentul document în care peptida face parte dintr-o proteină de fuziune, care cuprinde în special aminoacizi N-terminali ai lanțului invariant (Ii) asociat cu antigenul HLA-DR sau în care peptida este fuzionată cu (sau în) un anticorp, cum ar fi, de exemplu, un anticorp care este specific pentru celulele dendritice.

Prezenta descriere se referă în plus la un acid nucleic care codifică peptidele în conformitate cu descrierea din prezentul document, cu condiția ca peptida să nu fie proteina umană completă (întreagă).

Prezenta descoperire referă în continuare la acidul nucleic descris în prezentul document, care este ADN, ADNc, APN, ARN sau combinații ale acestora.

Prezenta descoperire se referă în continuare la un vector de exprimare care este capabil să exprime un acid nucleic așa cum este descris în prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o peptidă conform descrierii din prezentul

document, un acid nucleic conform descrierii din prezentul document sau un vector de exprimare conform descrierii din prezentul document pentru utilizare în medicină, în special în tratamentul HCC.

Prezenta descriere se referă în continuare la o celulă gazdă cuprinzând un acid nucleic în conformitate cu descrierea din prezentul document sau un vector de exprimare în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la celula-gazdă în conformitate cu descrierea din prezentul document, care este o celulă prezentatoare de antigen și, de preferință, este o celulă dendritică.

Prezenta descoperire se referă în continuare la metoda în conformitate cu descrierea din prezentul document în care antigenul este încărcat pe molecule de MHC de clasă I sau II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen.

Prezenta descoperire se referă în continuare la metoda descrisă în prezentul document în care celula prezentatoare de antigen cuprinde un vector de exprimare capabil să exprime respectiva peptidă care conține SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau varianta menționată de secvență de aminoacizi.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la utilizarea oricărei peptide descrise, a unui acid nucleic în conformitate cu descrierea din prezentul document, a unui vector de exprimare în conformitate cu descrierea din prezentul document, a unei celule în conformitate cu descrierea din prezentul document sau a unei limfocite T citotoxice activată în conformitate cu descrierea din prezentul document ca medicament sau în fabricarea unui medicament. Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu descrierea din prezentul document în care medicamentul este activ împotriva cancerului.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu descrierea din prezentul document în care medicamentul este un vaccin. Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu descrierea din prezentul document în care medicamentul este activ împotriva cancerului.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu descrierea din prezentul document în care celulele canceroase menționate sunt celule HCC sau alte celule

tumorale solide sau hematologice, cum ar fi cele de cancer pancreatic, cancer cerebral, cancer renal, cancer de colon sau rectal ori leucemie.

Prezenta descoperire se referă în continuare la proteine marker și biomarkeri particulari pe baza peptidelor descrise în prezentul document, numite în prezentul document „ținte”, care pot fi utilizate în diagnosticarea și/sau prognosticul CRC. Prezenta invenție se referă, de asemenea, la utilizarea acestor ținte noi pentru tratarea cancerului.

Termenul „anticorp” sau „anticorpi” este utilizat aici într-un sens larg și include anticorpi atât policlonali, cât și monoclonali. În plus față de moleculele de imunoglobulină intacte sau „complete”, în termenul „anticorpi” sunt incluse, de asemenea, fragmente (de exemplu, fragmente de CDR, Fv, Fab și Fc) sau polimeri ai acelor molecule de imunoglobulină și versiunile umanizate ale moleculelor de imunoglobulină, atât timp cât acestea manifestă oricare dintre proprietățile dorite (de exemplu, legarea specifică a unei polipeptide marker HCC, livrarea unei toxine într-o celulă de HCC care exprimă o genă marker de cancer la un nivel crescut și/sau inhibarea activității unei polipeptide marker de HCC) în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Ori de câte ori este posibil, anticorpii descoperirii pot fi achiziționați din surse comerciale. Anticorpii din descoperire pot fi generați, de asemenea, folosindu-se metode bine cunoscute. Specialiștii în domeniu vor înțelege că pot fi utilizați fie polipeptide markeri de HCC de lungime completă, fie fragmente ale acestora pentru generarea anticorpilor în conformitate cu descoperirea. O polipeptidă de utilizat pentru generarea unui anticorp din descoperire poate fi purificată parțial sau complet dintr-o sursă naturală sau poate fi produsă utilizându-se tehnici cu ADN recombinant.

De exemplu, un ADNc care codifică o peptidă în conformitate cu descrierea din prezentul document, cum ar fi o peptidă în conformitate cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300, o polipeptidă ori o variantă sau un fragment al acesteia, poate fi exprimat în celule procariote (de exemplu, bacterii) sau celule eucariote (de exemplu, celule de drojdii, de insecte sau de mamifere), după care proteina recombinantă poate fi purificată și utilizată pentru a genera un preparat de anticorpi monoclonali sau policlonali care leagă în mod specific polipeptida marker de HCC utilizată pentru a genera anticorpul, în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Un specialist în domeniu va realiza că generarea a două sau mai multe seturi diferite de anticorpi monoclonali sau policlonali maximizează probabilitatea obținerii unui anticorp

cu specificitatea și afinitatea necesare utilizării sale preconizate (de exemplu, ELISA, imunohistochimie, imagistică *in vivo*, terapie cu imunotoxine). Anticorpul este testat pentru activitatea dorită prin metode cunoscute, în conformitate cu scopul pentru care anticorpul urmează să fie utilizat (de exemplu, ELISA, imunohistochimie, imunoterapie etc.), pentru îndrumări suplimentare privind generarea și testarea anticorpilor (vezi, de exemplu, Harlow și Lane, 2013). De exemplu, anticorpul poate fi testat în teste ELISA, imunoamprente (Western blots), colorare imunohistochimică a cancerelor fixate cu formalină sau secțiuni de țesut înghețat. După caracterizarea inițială *in vitro*, anticorpul destinat utilizării diagnostice terapeutice sau *in vivo* este testat conform metodelor cunoscute de testare clinică.

Termenul „anticorp monoclonal”, așa cum este utilizat aici, se referă la un anticorp obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi, adică anticorpul individual cuprinzând populația este identic, cu excepția mutațiilor posibile în mod natural care pot fi prezente în cantități minore. Anticorpul monoclonal descrie în mod specific includ anticorpi „himerici”, în care o porțiune din catena grea și/sau ușoară este identică sau omoloagă cu secvențele corespunzătoare din anticorpi derivați dintr-o specie particulară sau aparținând unei anumite clase sau subclase de anticorpi, în timp ce restul catenei (catenelor) este identic sau omolog cu secvențele corespunzătoare din anticorpul derivat de la o altă specie sau aparținând unei alte clase sau subclase de anticorpi, precum și fragmente ale unor astfel de anticorpi, atât timp cât aceștia prezintă activitatea antagonistă dorită (US 4,816,567).

Anticorpul monoclonal al invenției poate fi generat folosindu-se metode de hibridom. Într-o metodă de hibridom, un șoarece sau alt animal-gazdă adecvat este, de obicei, imunizat cu un agent de imunizare pentru a obține limfocite care produc sau sunt capabile să producă anticorpi care se vor lega în mod specific la agentul imunizant. Ca alternativă, limfocitele pot fi imunizate *in vitro*.

Anticorpul monoclonal poate fi obținut, de asemenea, prin metode de ADN recombinant, cum ar fi cele descrise în US 4,816,567. ADN-ul care codifică anticorpul monoclonal al invenției poate fi izolat ușor și secvențializat utilizându-se proceduri convenționale (de exemplu, prin utilizarea probelor oligonucleotidice care sunt capabile să se lege în mod specific la genele codificatoare ale catenelor grele și ușoare ale anticorpilor murinici).

Metodele *in vitro* sunt, de asemenea, adecvate pentru prepararea anticorpilor monovalenți. Digestia anticorpilor pentru a produce fragmente ale acestora, în particular fragmente Fab, poate fi realizată folosindu-se tehnici de rutină cunoscute în domeniu. De exemplu, digestia

poate fi efectuată folosindu-se papaină. Exemple de digestie cu papaină sunt descrise în WO 94/29348 și US 4,342,566. Digestia cu papaină a anticorpilor produce, de obicei, două fragmente identice de legare la antigen, numite fragmente Fab, fiecare cu un singur situs de legare a antigenului și un fragment Fc rezidual. Tratamentul pepsinei generează un fragment $F(ab')_2$ și un fragment pFc'.

Fragmentele de anticorpi, fie că sunt atașate la alte secvențe sau nu, pot include de asemenea inserții, deleții, substituții sau alte modificări selectate ale unor regiuni particulare sau reziduuri specifice de aminoacizi, cu condiția ca activitatea fragmentului să nu fie modificată sau degradată în mod semnificativ față de anticorpul nemodificat sau fragmentul de anticorp. Aceste modificări pot furniza unele proprietăți suplimentare, cum ar fi eliminarea/adăugarea de aminoacizi capabili de legare la disulfuri, creșterea biolongevității, modificarea caracteristicilor secretoare etc. În orice caz, fragmentul de anticorp trebuie să posede o proprietate bioactivă, cum ar fi activitatea de legare, reglarea legării la domeniul de legare, etc. Regiunile funcționale sau active ale anticorpului pot fi identificate prin mutageneza unei regiuni specifice a proteinei, urmată de exprimarea și testarea polipeptidei exprimate. Astfel de metode sunt ușor de înțeles pentru un specialist în domeniu și pot include mutageneza specifică situsului acidului nucleic care codifică fragmentul de anticorp.

Anticorpii conform invenției pot cuprinde suplimentar anticorpi umanizați sau anticorpi umani. Formele umanizate ale anticorpilor non-umani (de exemplu, murini) sunt imunoglobuline himerice, catene de imunoglobulină sau fragmente ale acestora (cum ar fi Fv, Fab, Fab' sau alte subsecvențe de legare la antigenului ale anticorpilor) care conțin o secvență minimă derivată din imunoglobulină non-umană. Anticorpii umanizați includ imunoglobuline umane (anticorp receptor) în care resturile dintr-o regiune determinantă complementară (CDR) a recipientului sunt înlocuite cu resturi dintr-o CDR a unei specii non-umane (anticorp donor), de exemplu de șoarece, șobolan sau iepure cu specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite. În unele cazuri, resturile de cadru Fv (FR) ale imunoglobulinei umane sunt înlocuite cu resturi non-umane corespunzătoare. Anticorpii umanizați pot cuprinde, de asemenea, resturi care nu se găsesc nici în anticorpul receptor, nici în secvențele de CDR sau de cadru importate. În general, anticorpul umanizat va cuprinde, practic, toate cel puțin unul și, de obicei, două domenii variabile în care toate sau, practic, toate regiunile CDR corespund cu cele ale unei imunoglobuline non-umane și toate sau, practic, toate regiunile FR sunt cele ale unei secvențe de consens a imunoglobulinelor umane. Anticorpul umanizat optim va cuprinde, de asemenea, cel puțin

o porțiune dintr-o regiune constantă de imunoglobulină (Fc), de obicei cea a unei imunoglobuline umane.

Metodele de umanizare a anticorpilor non-umani sunt bine cunoscute în domeniu. În general, un anticorp umanizat are unul sau mai multe resturi de aminoacid introduse în el dintr-o sursă non-umană. Aceste reziduuri de aminoacid non-umane sunt adesea denumite reziduuri de „import”, care sunt, de obicei, luate dintr-un domeniu variabil de „import”. Umanizarea poate fi realizată, practic, prin substituirea CDR-urilor sau a secvențelor CDR de la rozătoare pentru secvențele corespunzătoare unui anticorp uman. În consecință, astfel de anticorpi „umanizați” sunt anticorpi himerici (US 4,816,567), în care, practic, mai puțin de un domeniu variabil uman intact a fost substituit cu secvența corespunzătoare de la o specie non-umană. În practică, anticorpii umanizați sunt, de obicei, anticorpi umani în care unele resturi CDR și, posibil, unele resturi FR sunt substituite cu resturi din situsuri analoge în anticorpi de la rozătoare.

Pot fi folosite animale transgenice (de exemplu, șoareci), care sunt capabile, după imunizare, să producă un repertoriu complet de anticorpi umani în absența producției de imunoglobulină endogenă. De exemplu, a fost descris că deleția homozigotă a genei regiunii de legare a catenei grele de anticorp la șoareci mutanți himeric și de filiație germinală conduce la inhibarea completă a producției de anticorpi endogeni. Transferul seriei de gene de imunoglobulină cu filiație germinală umană în astfel de șoareci mutanți cu filiație germinală va conduce la producerea de anticorpi umani după provocarea de către un antigen. Anticorpii umani pot fi, de asemenea, produși în biblioteci de afișare a fagilor.

Anticorpii din invenție sunt, preferabil, administrați unui subiect într-un agent purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic. În mod obișnuit, o cantitate adecvată dintr-o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este utilizată în formulă pentru a face formularea izotonică. Exemplele de agent purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic includ soluția salină, soluția Ringer și soluția de dextroză. pH-ul soluției este, preferabil, de la aproximativ 5 la aproximativ 8 și, mai preferabil, de la aproximativ 7 până la aproximativ 7,5. Agenții purtători suplimentari includ preparate cu eliberare prelungită, de exemplu matrice semipermeabile de polimeri hidrofobi solizi care conțin anticorpul, matricele fiind sub formă de articole formate, de exemplu, pelicule, lipozomi sau microparticule. Va fi evident pentru persoanele de specialitate din domeniu că anumiți agenți purtători pot fi mai preferabili în funcție de, de exemplu, calea de administrare și concentrația anticorpului care este administrat.

Anticorpul pot fi administrați subiectului, pacientului sau celulei prin injectare (de exemplu, intravenoasă, intraperitoneală, subcutanată, intramusculară) sau prin alte metode, cum ar fi perfuzia, care asigură eliberarea sa în sânge într-o formă eficientă. De asemenea, anticorpul pot fi administrați pe căi intratumorale sau peritumorale pentru a exercita efecte terapeutice locale, precum și sistemice. Este preferabilă injectarea locală sau intravenoasă.

Dozele și schemele eficiente pentru administrarea anticorpilor pot fi determinate empiric și realizarea unor astfel de determinări se află în domeniul de specialitate. Specialiștii în domeniu vor înțelege că doza de anticorpi care trebuie administrată va varia în funcție de, de exemplu, subiectul care va primi anticorpi, calea de administrare, de tipul particular de anticorpi utilizat și alte medicamente administrate. O doză zilnică tipică de anticorpi utilizat singur poate varia de la aproximativ 1 $\mu\text{g/kg}$ până la 100 mg/kg de greutate corporală sau mai mult pe zi, în funcție de factorii menționați mai sus. După administrarea unui anticorpi, preferabil pentru tratarea HCC, eficacitatea anticorpului terapeutic poate fi evaluată în diverse moduri bine cunoscute de către specialiștii în domeniu. De exemplu, mărimea, numărul și/sau distribuția cancerului la un subiect care primește tratament pot fi monitorizate utilizându-se tehnici standard de imagistică tumorală. Un anticorpi administrat terapeutic care oprește creșterea tumorii, are ca rezultat contracția tumorală și/sau împiedică dezvoltarea de tumori noi în comparație cu evoluția bolii care ar avea loc în absența administrării anticorpului este un anticorpi eficient pentru tratamentul cancerului.

Deoarece peptidele menționate în tabelele de mai sus ale descrierii și, prin urmare, polipeptidele subiacente sunt foarte bine exprimate în HCC și sunt exprimate la niveluri mai degrabă până la extrem de scăzute în celulele normale, inhibarea unei proteine selectate din grupul format din produsele proteice ale următoarelor gene: Preferred for the inhibition and for antibodies and/or TCRs are GLUL, GPAM, PLIN2, SLC16A1, SLC9A3R1, PCBD1, SEC16A, AKR1C4, ABCB11, HAL, CYP2E1, C4A, C4B, ALDH1L1, CRP, ACSL4, EEF2, HLTF, FBXO22, GALK1, TMC01, TMEM33, ZNF318, IPO9, AMACR, C1QTNF3, CYP4F8, CYP4F3, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, MOCOS, A1CF, COL18A1, HPR, LBP, C19orf80, CFHR5, ITIH4, TMEM110, LARP4, LMF2, SLC10A5, and SLC16A11; still preferred for the inhibition and for antibodies and/or TCRs are ANKFYI, C12orf44, C16orf58, CPSF1, DCAF8, PEX19, DDX11, DDX12P, DECR2, NME4, DENND5B, DYM, EDC4, ERI3, FAM20A, FNDC3A, GPR107, GYG2, HEATR2, IFT81, KCTD3, SHKBP1, KIAA1324L, KLHL24, MARCH6, MBTPS2, MIR1279, CPSF6, NOC4L, NXF1, PANK2, PCNXL3, PIPSL, PSMD4, PSMD14, SLC35B1, TCP11L2, THNSL2, THOC2, T0MM5, TRAPPC6B, TRIM54, TRIM55,

TRIM63, UGGT2, URB1, VPS54, WIZ, ZNF451, RFTN2, SCFD1, SERINC5, CCT7P2, CMAS, ANKS1A, C17orf70, CCT7, CDK5RAP2, CLPTM1, și cele mai preferate pentru inhibare și pentru anticorpi și/sau TCR-uri sunt APOB, FASN și/sau COPA; iar expresia sau activitatea acestor markeri poate fi integrată de preferință într-o strategie terapeutică, de exemplu pentru tratarea sau prevenirea HCC.

Principiul de terapie anti-sens este bazat pe ipoteza că supresia, specifică secvenței, a exprimării genice (prin transcripție sau translație) se poate obține prin hibridizare intracelulară între ADN sau ARNm genomic și specii complementare anti-sens. Formarea unui asemenea duplex de acid nucleic hibrid interferează cu transcripția ADN-ului genomic care codifică antigenul țintă tumoral sau cu procesarea/transportul/translația și/sau stabilitatea ARNm-ului pentru antigenul-țintă tumoral.

Acizii nucleici anti-sens se pot administra printr-o varietate de metode. De exemplu, oligonucleotidele anti-sens sau ARN-ul anti-sens se pot administra direct (de exemplu, prin injectare intravenoasă) unui subiect într-o formă care permite captarea în celulele tumorale. Alternativ, vectorii virali sau plasmidici care codifică ARN-ul anti-sens (sau fragmente de ARN) se pot introduce în celule *in vivo*. Efectele anti-sens se pot induce prin secvențe de sens; totuși, extensia modificărilor fenotipice este foarte variabilă. Modificările fenotipice induse de tratamentul anti-sens eficace sunt evaluate conform modificărilor apărute, de exemplu, în valorile ARNm-ului țintă, valorile proteinelor-țintă și/sau nivelul de activitate al proteinelor-țintă.

Într-un exemplu specific, inhibarea funcției de țintă/marker HCC prin terapie genică anti-sens se poate obține prin administrarea directă de ARN marker tumoral anti-sens unui subiect. Markerul tumoral ARN anti-sens se poate produce și izola prin orice tehnică standard, dar este cel mai convenabil produs prin transcripție *in vitro* folosindu-se marker ADNc tumoral anti-sens sub controlul unui promotor de mare eficacitate (de exemplu, promotorul T7). Administrarea unui marker tumoral ARN anti-sens unor celule se poate face prin oricare dintre metodele pentru administrarea directă de acid nucleic descrisă mai jos.

O strategie alternativă pentru inhibarea funcției unei proteine selectate din grupul format din proteinele menționate mai sus și, cel mai preferabil, din APOB, FASN și/sau COPA, implică utilizarea unui acid nucleic (de exemplu, siARN sau un acid nucleic care codifică un anticorp antiproteic sau o porțiune a acestuia, care poate fi transferat în celulele canceroase sau în alte celule, ceea ce duce la exprimarea și secreția intracelulară a

anticorpului), o proteină sau o moleculă mică ori orice alt compus care vizează exprimarea, translația și/sau funcția biologică a acestei proteine.

În metodele descrise mai sus, care includ administrarea și absorbția ADN-ului exogen în celulele unui subiect (adică, transducția sau transfecția genică), acizii nucleici din prezenta descoperire pot fi sub formă de ADN gol sau acizii nucleici pot fi într-un vector pentru eliberarea acizilor nucleici în celule pentru inhibarea exprimării proteinei marker pentru HCC. Vectorul poate fi un preparat disponibil comercial, de exemplu un vector de adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canada). Livrarea acidului nucleic sau a vectorului în celule poate fi realizată printr-o varietate de mecanisme. Ca un exemplu, livrarea poate fi realizată printr-un lipozom utilizându-se preparate lipozomale disponibile în comerț, de exemplu Lipofectin, Lipofectamine (GIBCO-25 BRL, Inc., Gaithersburg, Md.), Superfect (Qiagen, Inc. Hilden, Germania) și Transfectam Biotec, Inc., Madison, Wis., SUA), precum și alte lipozomi dezvoltati conform procedurilor standard din domeniu. În plus, acidul nucleic sau vectorul din această descoperire poate fi livrat *in vivo* prin electroporare, pentru care este disponibilă tehnologia de la Genetronics, Inc. (San Diego, SUA), precum și prin intermediul unui aparat Sonoporation (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Arizona, SUA).

De exemplu, livrarea vectorului se poate face printr-un sistem viral, cum ar fi un sistem de vector retroviral care poate ambala un genom retroviral recombinant. Retrovirusul recombinant se poate apoi folosi pentru a infecta și, prin urmare, pentru a livra în celulele infectate acid nucleic anti-sens care inhibă exprimarea unei proteine selectate dintr-un grup constând din proteinele menționate mai sus. Metoda exactă de introducere a acidului nucleic alterat în celulele de mamifere nu este, desigur, limitată la folosirea de vectori retrovirali. Pentru această procedură sunt disponibile și alte tehnici disponibile pe scară largă, inclusiv folosirea de vectori adenovirali, vectori asociați adeno-virusurilor (AAV), vectori lentivirali, vectori retrovirali pseudotipați. De asemenea, se pot utiliza tehnici de transducție fizică, cum ar fi livrarea de lipozomi și alte mecanisme de endocitoză mediată de receptor sau de alt tip. Această invenție se poate folosi în asociere cu oricare dintre aceste metode de transfer genic, precum și cu alte metode folosite frecvent.

Anticorpii pot fi utilizați, de asemenea, pentru teste diagnostice *in vivo*. În general, anticorpii sunt etichetați printr-o radionucleotidă (cum ar fi ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P sau ^{35}S), astfel încât tumora să poată fi localizată folosind imunoscintigrafie. Într-una dintre realizări, anticorpii sau fragmentele acestora se leagă la domeniile extracelulare a

două sau mai multe ținte ale unei proteine selectate din grupul format din proteinele menționate mai sus, iar valoarea de afinitate (Kd) este mai mică de 1×10^{-6} M.

Anticorpii pentru utilizare diagnostică pot fi etichetați cu sonde adecvate pentru detectarea prin diferite metode imagistice. Metodele pentru detectarea sondelor includ, dar nu se limitează la, fluorescență, lumină, microscopie confocală și electronică; imagistică prin rezonanță magnetică și spectroscopie; fluoroscopie, tomografie computerizată și tomografie cu emisie de pozitroni. Sondele adecvate includ, dar nu se limitează la, fluoresceină, rodamină, eozină și alți fluorofori, radioizotopi, aur, gadolinu și alte lantanide, fier paramagnetic, fluor-18 și alți radionuclizi cu emisie de pozitron. În plus, probele pot fi bi- sau multifuncționale și pot fi detectate folosind una sau mai multe dintre metodele prezentate aici. Acești anticorpi pot fi marcați direct sau indirect cu sondele menționate. Atașarea probelor la anticorpi implică atașarea covalentă a probei, încorporarea probei în anticorp și atașarea covalentă a unui compus chelator pentru legarea probei, printre alte acțiuni bine cunoscute în domeniu. Pentru imunohistochimie, proba de țesut bolnav poate fi proaspătă sau congelată ori poate fi încorporată în parafină și fixată cu un conservant, cum ar fi formalina. Secțiunea fixată sau încorporată care conține proba intră în contact cu un anticorp etichetat principal și cu un anticorp secundar, anticorp folosit pentru a detecta exprimarea proteinelor *in situ*.

După cum s-a menționat mai sus, prezenta descoperire furnizează, astfel, o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă a acesteia care este 90% omologă SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă a acesteia care va induce reactivitate încrucișată a celulelor T cu peptida menționată. Peptidele din descoperire au capacitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau de versiuni alungite ale peptidelor menționate la clasa II.

În prezenta descoperire, termenul „omolog” se referă la gradul de identitate (consultați secțiunea „Identitate procentuală” de mai sus) dintre secvențele a două secvențe de aminoacizi, adică secvențe peptidice sau polipeptidice. Anterior menționata „omologie” se stabilește prin compararea a două secvențe aliniate în condiții optime cu secvențele care vor trebui comparate. O astfel de omologie a secvenței se poate calcula prin crearea unei alinieri folosind, de exemplu, algoritmul ClustalW. Programe de analiză a secvenței disponibile în mod obișnuit, mai specific Vector NTI, GENETYX sau alte instrumente de analiză sunt furnizate de baze de date publice.

Specialiștii în domeniu vor putea analiza dacă celulele T induse de o variantă a peptidei specifice vor putea reacționa încrucișat cu peptida în sine (Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006 ; Appay et al., 2006).

Prin „variantă” a secvenței date de aminoacizi, inventatorii se referă la faptul că lanțurile secundare provenite, de exemplu, de la unul sau două resturi aminoacid sunt modificate (de exemplu prin substituirea lor cu lanțul secundar al altui rest aminoacid natural sau cu un alt lanț secundar) astfel încât peptida să fie în continuare capabilă să se lege de molecula HLA în principal în același mod ca și peptida care conține secvența dată de aminoacid constând din SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300. De exemplu, o peptidă se poate modifica astfel încât aceasta să mențină, dacă nu să amelioreze posibilitatea de a interacționa cu și de a se lega de un situs de legare al unei molecule MHC adecvate, cum ar fi HLA-A*02 sau –DR, și astfel să mențină cel puțin, dacă nu să îmbunătățească abilitatea de a se lega la TCR pentru celule T activate.

Aceste celule T pot apoi reacționa încrucișat cu celulele și pot distruge celulele care exprimă o polipeptidă care conține secvența naturală de aminoacizi a peptidei înrudite definite în descrierea descoperirii. După cum poate fi derivat din literatura științifică (Godkin et al., 1997) și bazele de date (Rammensee et al., 1999), anumite poziții ale peptidelor care leagă HLA sunt de obicei reziduuri ancoră care constituie o secvență centrală care corespunde tiparului de cuplare al incizurii de cuplare a receptorului HLA, care este definit de proprietățile polare, electrofizice, hidrofobe și spațiale ale lanțului polipeptidei care constituie incizura de cuplare. Astfel, un expert în domeniu ar putea modifica secvențele de aminoacizi stabilite în SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300, prin menținerea resturilor-ancoră, și vor putea stabili dacă aceste variante își mențin abilitatea de a se lega de moleculele MHC de clasă I sau II. Variantele prezentei descoperiri își păstrează abilitatea de a lega TCR pentru celule T activate, care pot reacționa încrucișat cu celulele și pot ucide celulele care exprimă polipeptida care conține secvența naturală de aminoacid a peptidei înrudite definite în descrierea invenției.

Reziduurile aminoacidice care nu contribuie substanțial la interacțiunea cu receptorul celulelor T pot fi modificate prin substituirea cu alți aminoacizi a căror încorporare nu modifică substanțial reactivitatea celulelor T și care nu elimină cuplarea cu MHC relevant. Astfel, cu excepția condiției explicate, peptida care face obiectul descoperirii poate fi orice peptidă (termen în care includem și oligopeptide sau polipeptide) care include secvențele de aminoacizi sau o porțiune sau variantă a acestora.

Aceste resturi de aminoacid care nu contribuie substanțial la interacțiunea cu TCR-ul pot fi modificate prin substituirea cu alți aminoacizi a căror încorporare nu modifică substanțial reactivitatea celulelor T și care nu elimină cuplarea cu MHC relevant. Astfel, cu excepția condiției explicate, peptida care face obiectul invenției poate fi orice peptidă (termen în care includem și oligopeptide, și polipeptide) care include secvențele de aminoacizi sau o porțiune sau variantă a acestora.

Pot fi adecvate, de asemenea, peptide mai lungi. Este, de asemenea, posibil ca epitopii MHC de clasă I, deși de obicei cu lungimea de 8-11 aminoacizi, să fie generați prin procesarea peptidelor provenite din peptide sau proteine mai lungi care includ epitopul efectiv. Este preferabil ca resturile care flanchează epitopul efectiv să fie resturi care să nu influențeze substanțial clivajul proteolitic necesar pentru expunerea epitopului efectiv în timpul procesării.

În consecință, prezenta descoperire furnizează peptide și variante de epitopi MHC de clasă I, în care peptida sau varianta are o lungime totală cuprinsă între 8 și 100, preferabil între 8 și 30, și, cel mai preferabil, între 8 și 14, și anume 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoacizi; în cazul peptidelor de legare de clasă II alungite, lungimea poate fi, de asemenea, de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 sau 22 de aminoacizi.

Desigur, peptida sau varianta în conformitate cu prezenta descoperire va avea capacitatea să se lege de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I or II.

Legarea unei peptide sau a unei variante la un complex MHC poate fi testată prin metode cunoscute în domeniu.

Într-o realizare preferată în mod special a descoperirii, peptida constă sau constă în esență dintr-o secvență de aminoacizi conformă cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300.

„Constând în esență din” înseamnă că o peptidă în conformitate cu prezenta descoperire, pe lângă secvența în conformitate cu oricare dintre SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă a acestora, conține segmente de aminoacid N-terminale sau C-terminale care nu fac în mod necesar parte din peptida care funcționează ca epitop pentru molecule MHC.

Totuși, aceste resturi pot fi importante pentru a furniza o introducere adecvată a peptidei care face obiectul prezentei descoperiri în interiorul celulei. Într-o concretizare a prezentei

descoperiri, peptida face parte dintr-o proteină de fuziune care conține, de exemplu, cei 80 aminoacizi N-terminali ai lanțului invariabil asociat antigenului HLA-DR (p33, următoarea „li”) derivați din NCBI, număr de identificare GenBank X00497. În alte fuziuni, peptidele din prezenta descoperire pot fi fuzionate la un anticorp așa cum este descris în prezentul document, sau o parte funcțională a acestuia, în special într-o secvență a unui anticorp, astfel încât să fie direcționate în mod specific de respectivul anticorp, sau, de exemplu, către sau într-un anticorp care este specific pentru celulele dendritice descrise în prezentul document.

În plus, peptida sau varianta pot fi ulterior modificate pentru a îmbunătăți stabilitatea și/sau legarea de molecule MHC pentru a exercita un răspuns imun mai puternic. Metodele pentru această optimizare a secvenței de peptidă este cunoscută în domeniu și poate include, de exemplu, introducerea unor legături peptidice inversate sau a unor legături non-peptidice.

Într-o legătură peptidică inversată, reziduurile aminoacidice nu sunt unite prin legături peptidice (-CO-NH-), ci legătura peptidică este inversată. Astfel de retro-inverso peptidomimetice se pot obține folosind metodele cunoscute în literatura de specialitate, cum ar fi de exemplu cele descrise în Meziere et al. (1997). Această abordare implică sinteza de pseudopeptide care conțin modificări care implică scheletul și nu orientarea lanțurilor secundare. Meziere et al (1997) demonstrează că aceste pseudopeptide sunt utile pentru legarea MHC și răspunsurile celulelor T helper. Peptidele retro-inversate, care conțin legături NH-CO și nu legături peptidice CO-NH, sunt mult mai rezistente la proteoliză.

O legătură non-peptidică este, de exemplu, -CH₂-NH, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, și -CH₂SO-. US 4,897,445 furnizează o metodă pentru sinteza în fază solidă a unor legături non-peptidice (-CH₂-NH) în lanțuri de polipeptide care implică polipeptide sintetizate de procedurile standard și legături non-peptidice sintetizate prin reacția dintre o amino-aldehidă și un aminoacid în prezența NaCNBH₃.

Peptidele care conțin secvențele descrise mai sus pot fi sintetizate cu ajutorul unor grupări chimice suplimentare prezente la capetele amino- sau carboxi-terminale, pentru a îmbunătăți stabilitatea, biodisponibilitatea și/sau afinitatea peptidelor. De exemplu, grupările hidrofobe, cum ar fi carbo-benzoxil, dansil sau T-butil-oxi-carbonil pot fi adăugate capătului peptidic amino-terminal. Similar, o grupare acetil sau o grupare 9-fluorenil-metoxi-carbonil se poate plasa la capătul amino-terminal al peptidei. În plus, grupările hidrofobe, cum ar T-butil-oxi-carbonil, sau o grupare amido- pot fi adăugate capătului peptidic amino-terminal.

Mai mult, peptidele din descoperire pot fi sintetizate în funcție de configurația lor sterică. De exemplu, se poate utiliza izomerul D al unuia sau mai multor resturi de aminoacid peptidic în locul izomerului L uzual. Ba chiar mai mult, cel puțin unul dintre resturile de aminoacid al peptidei din descoperire poate fi substituit cu unul dintre resturile de aminoacid cunoscute, care nu apar în mod natural. Alterări de tipul acestora pot ajuta la creșterea stabilității, biodisponibilității și/sau legării peptidelor care fac obiectul descoperirii.

Similar, o peptidă sau o variantă a descoperirii se poate modifica din punct de vedere chimic prin reacții cu diverși aminoacizi înainte sau după sinteza peptidei. Exemplele acestor modificări sunt bine cunoscute în domeniu și sunt rezumate, de exemplu, în R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2005. Modificarea chimică a aminoacizilor include, fără a se limita la, modificarea prin acilare, amidinare, piridoxilarea lizinei, alkilare reductivă, trinitrobenzilarea grupurilor amino cu acid 2,4,6-trinitrobenzen sulfonic (TNBS), modificarea amidică a grupărilor carboxil și sulfhidril prin oxidarea cu acid performic a cisteinei la acid cisteic, formarea de derivați de mercur, formarea de disulfide mixte cu alți compuși tiolici, reacția cu maleimidă, carboximetilarea cu acid iodoacetic sau iodoacetamidă și carbamoilare cu cianat la pH alcalin, deși fără a se limita la acestea. În aceste privințe, doritorii sunt trimiși la Capitolul 15 al protocolului prezent din *Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) pentru metodologia extinsă legată de modificarea chimică a proteinelor.

Pe scurt, modificarea de exemplu a resturilor arginil sunt de obicei bazate pe reacția dintre compușii dicarbonil vecini cum ar fi fenilglioal, 2, 3-butandionă, și 1,2-ciclohexan-dionă pentru formarea unui aduct. Un alt exemplu este reacția dintre metilglioal și resturile de arginină. Cisteina se poate modifica fără modificarea concomitentă a altor situri nucleofile cum ar fi lizina și histidina. Ca rezultat, pentru modificarea cisteinei sunt disponibili un număr mare de reactivi. Paginile unor companii cum ar fi Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) pot furniza informații despre anumiți reactivi.

Reducerea selectivă a punților disulfidice din proteine este și ea frecventă. Punțile disulfidice se pot forma și oxida prin tratamentul termic al produselor biofarmaceutice. Reactivul K de la Woodward se poate folosi pentru modificarea resturilor de acid glutamic. N-(3-(dimetil-amino)propil)-N'-etilcarbodiimida se poate folosi pentru a forma legături intra-moleculare între un rest de lizină și un rest de acid glutamic. De exemplu, dietilpirocarbonatul este un reactiv pentru modificarea resturilor de histidil din proteine.

Histidina se poate modifica la rândul sau folosind 4-hidroxi-2-nonenal. Reacția resturilor de lizină și a altor grupări α -amino este utilă, de exemplu, pentru legarea peptidelor de suprafețe sau de legături încrucișate proteine-peptide. Liza este locul de atașare a poli(etilen)glicolului și locul principal de modificare în cazul glicozilării proteinelor. Resturile de metionină din proteine se pot modifica de exemplu folosind iodoacetamidă, brometilamină și cloramină T.

Tetranitrometanul și N-acetil-imidazolul se pot folosi pentru modificarea resturilor tirozil. Legarea încrucișată prin formarea de ditirosină poate fi realizată cu ioni de cupru sau apă oxigenată.

Studii recente privind modificarea triptofanului au utilizat N-bromosuccinimidă, bromură 2-hidroxi-5-nitrobenzil sau 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol (BPNS-scatol).

Modificarea cu succes a proteinelor și peptidelor terapeutice cu PEG este adesea asociată cu o extindere a timpului de înjumătățire circulatorie în timpul legării încrucișate a proteinelor cu glutaraldehydă, diacrilat de polietilen-glicol, iar formaldehyda este utilizată pentru pregătirea hidrogelurilor. Modificarea chimică a alergenilor pentru imunoterapie este obținută adesea prin carbamilare cu cianat de potasiu.

O peptidă sau o variantă, în care peptida este modificată sau include legături non-peptidice reprezintă un exemplu preferat al descoperirii. În general, peptidele și variantele (cel puțin cele care conțin legături peptidice între resturile de acid amino) pot fi sintetizate prin modul Fmoc-poliamidă al sintezei peptidelor în stare solidă, după cum se arată în Lukas et al. (Solid-phase peptide synthesis under continuous-flow conditions. Proc Natl Acad Sci U S A. May 1981; 78(5): 2791–2795) și referințele citate. Protecția temporară a grupării N-amino este asigurată de gruparea 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc). Clivajul repetitiv al acestei grupări de protecție cu intensă labilitate de bază este realizat folosind 20% piperidină în N,N-dimetilformamidă. Funcționalitățile lanțurilor secundare se pot proteja sub forma butil-eterilor (în cazul serinei, treoninei și tirozinei), a butil-esterilor (în cazul acizilor glutamic și aspartic), a derivaților butiloxycarbonil (în cazul lizinei și histidinei), a derivaților tritol (în cazul cisteinei) și a derivaților de 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzensulfonil (în cazul argininei). Dacă resturile C-terminale sunt glutamina sau asparagina, pentru protejarea funcției amido a lanțului secundar se va folosi gruparea 4,4'-dimetoxibenzhidril. Suportul în faza solidă este furnizat de un polimer polidimetil-acrilamidă format din cei trei monomeri dimetilacrilamidă (schelet-monomer), bisacriloeilen diamină (agent de

legătură) și acrilolsarcozin-metil-ester (agent de funcționalizare). Agentul de legătură peptidă-rășină scindabil folosit este derivatul labil în mediu acid al acidului 4-hidroximetil-fenoxiacetic. Toți derivații aminoacizi sunt adăugați sub formă de derivați simetrici anhidri preformați cu excepția asparaginei și glutaminei, care sunt adăugate folosind o procedură de cuplare inversă mediată de N,N-diciclohexil-carbodiimidă/1-hidroxibenzotriazol. Toate reacțiile de cuplare și deprotejare sunt monitorizate folosindu-se proceduri de testare care folosesc ninhidrină, trinitrobenzen, acid sulfonic sau izotină. După finalizarea sintezei, peptidele sunt scindate din suportul rezinic cu îndepărtarea concomitentă a grupărilor protectoare ale lanțurilor secundare prin tratarea cu acid trifluoroacetic 95% care conține un amestec curățător 50%. Substanțele de curățare folosite cel mai frecvent includ etanditiol, fenol, anisol și apă, alegerea exactă fiind dependentă de aminoacizii constituenți ai peptidei sintetizate. De asemenea, pentru sintetizarea peptidelor, se poate utiliza o combinație de metode în stare solidă și în stare de soluție (vezi, de exemplu, Bruckdorfer et al., 2004 și referințele citate în acest document).

Acidul trifluoroacetic este îndepărtat prin evaporare *in vacuo*, cu triturarea ulterioară cu dietileter, care duce la formarea peptidei brute. Toate substanțele de curățare prezente sunt eliminate printr-o procedură simplă de extragere, care, după liofilizare în fază apoasă, conduce la peptida brută fără substanțe de curățare. Reactivii pentru sinteza peptidelor sunt în general disponibili, de exemplu, de la Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Regatul Unit).

Purificarea poate fi realizată prin una sau mai multe tehnici, precum recristalizarea, cromatografia cu excludere dimensională, cromatografia cu schimb de ioni, cromatografia cu interacțiune hidrofobă și (de regulă) cromatografia lichidă de înaltă performanță în fază inversă, folosind, de exemplu, separare în gradient de acetonitril/apă.

Analiza peptidelor poate fi efectuată folosind cromatografie în strat subțire, electroforeză, în particular electroforeză capilară, extragere în fază solidă (CSPE), cromatografie lichidă de înaltă performanță în fază inversă, analiză a aminoacizilor după hidroliza acidă și prin analiză spectrometrică în masă la bombardarea rapidă cu atomi (FAB), dar și analiză spectrometrică în masă de tip MALDI și ESI-Q-TOF.

Un alt aspect al descoperirii furnizează un acid nucleic (de exemplu o polinucleotidă) care codifică o peptidă sau o variantă de peptidă din invenție. Polinucleotida poate fi, de exemplu, ADN, ADNc, APN, ARN sau o combinație a acestora, în helix simplu și/sau dublu sau în forme native sau stabilizate de polinucleotide, cum ar fi, de exemplu,

polinucleotidele cu bază de fosforotioat și poate conține sau nu introni, cu condiția să codifice pentru peptidă. Desigur, numai peptidele care conțin resturi de aminoacid existente în mod natural și unite prin legături peptidice care apar în mod natural sunt codificabile de o polinucleotidă. Un alt aspect al descoperirii constă în furnizarea unui vector de expresie capabil să exprime o polipeptidă conform descoperirii.

Au fost dezvoltate mai multe metode de legare a polinucleotidelor, în special a ADN-ului, de vectori, de exemplu, prin terminale coezive complementare. De exemplu segmentului ADN i se pot adăuga regiuni homopolimerice complementare care să fie introduse în ADN-ul vector. Vectorul și segmentul ADN sunt apoi unite prin punți de hidrogen între cozile complementare homopolimer pentru a forma molecule ADN recombinat.

Agenții de legătură sintetici care conțin unul sau mai multe situri limitative oferă o modalitate alternativă de alăturare a segmentelor ADN la vectori. Agenții de legare care conțin o varietate de situri de endonucleaze de restricție sunt disponibili comercial de la mai multe surse, dintre care amintim pe International Biotechnologies Inc., New Haven, CN, SUA.

O metodă preferabilă de modificare a ADN-ului care codifică polipeptida din descoperire utilizează reacția de polimerază în lanț descrisă de Saiki RK et al. (Saiki et al., 1988). Această metodă poate fi utilizată pentru introducerea ADN-ului într-un vector potrivit, de exemplu prin implementarea în locații cu restricții adecvate sau poate fi utilizată pentru modificarea ADN-ului în alte moduri, după cum este cunoscut în literatura de specialitate. În cazul utilizării unor vectori virali, sunt preferați vectorii virus variolic sau adenovirus.

ADN-ul (sau în cazul vectorilor retrovirali, ARN-ul) poate fi apoi exprimat într-o gazdă adecvată pentru a produce o polipeptidă compusă din peptidă sau varianta din descoperire. Prin urmare, ADN-ul care codifică peptida sau varianta din descoperire poate fi utilizat în conformitate cu tehnicile cunoscute, modificate corespunzător instrucțiunilor prezente, în vederea construirii unui vector de expresie, care este apoi utilizat pentru transformarea unei celule-gazdă corespunzătoare pentru exprimarea și producerea polipeptidei din descoperire. Astfel de tehnici includ cele descrise, de exemplu, în US 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075 și 4,810,648.

ADN-ul (sau în cazul vectorilor retrovirali, ARN-ul) care codifică polipeptida care formează compusul din descoperire poate fi cuplat cu o mare varietate de alte secvențe

ADN pentru introducerea într-o gazdă adecvată. ADN-ul însoțitor va depinde de natura gazdei, modul de introducere a ADN-ului în gazdă și dacă se dorește integrarea sau întreținerea episomală.

În general, ADN-ul este introdus într-un vector de exprimare, cum ar fi o plasmidă, cu orientarea corectă și intervalul potrivit de citire pentru exprimare. Dacă este necesar, ADN-ul poate fi corelat cu secvențele de nucleotide de transcripție și translație corespunzătoare, recunoscute de gazda dorită, cu toate că astfel de controale sunt disponibile în general în vectorul de exprimare. Vectorul este apoi introdus în gazdă prin tehnicile standard. În general, nu toate gazdele vor fi transformate de vector. Prin urmare, va fi nevoie de selectarea unor celule-gazdă transformate. Una dintre tehnicile de selectare implică înglobarea în vectorul de exprimare a unei secvențe ADN cu toate elementele de control necesare, care să codifice o trăsătură selectabilă din celula transformată, cum ar fi de exemplu rezistența la antibiotic.

Alternativ, gena unei asemenea trăsături selectabile poate fi pe un alt vector, care este folosit pentru a cotransforma celula-gazdă dorită.

Celulele-gazdă care au fost transformate de ADN-ul recombinant din descoperire sunt apoi cultivate un timp suficient și în condiții corespunzătoare, cunoscute celor inițiați, în conformitate cu îndrumările din acest document, pentru a permite exprimarea polipeptidei, care poate fi apoi recuperată.

Sunt cunoscute numeroase sisteme de exprimare, inclusiv bacterii (de exemplu, *E. coli* și *Bacillus subtilis*), levuri (de exemplu, *Saccharomyces cerevisiae*), fungi filamentoși (de exemplu, *Aspergillus spec.*), celule vegetale, celule animale și celule provenite de la insecte. Este de preferat ca sistemul să poată fi format din celule de mamifere, cum ar fi celulele CHO, disponibile din ATCC Cell Biology Collection.

Prezenta descoperire este legată și de o serie de celule-gazdă transformate cu un vector polinucleotidic, creat în cadrul prezentei invenții. Celula-gazdă poate fi procariotă sau eucariotă. Este posibil ca celulele bacteriene să fie celule-gazdă procariote preferate în anumite circumstanțe și, de regulă, sunt o tulpină de *E. coli*, cum ar fi, de exemplu, tulpinile *E. coli* DH5, disponibile de la Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, SUA, și RR1, disponibile de la American Type Culture Collection (ATCC) din Rockville, MD, SUA (No ATCC 31343). Printre celulele-gazdă eucariote se numără celulele de drojdie, insecte și mamifere, de preferință celule de vertebrate precum cele de la șoarece, șobolan,

maimuță sau linii de celule fibroblastice sau de colon umane. Celulele-gazdă provenite din drojdii includ YPH499, YPH500 și YPH501, care sunt disponibile în general de la Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA92037, SUA. Celulele-gazdă preferate provenite de la mamifere includ celulele ovariene de hamster chinezesc, disponibile de la ATCC ca CCL61, celulele embrionare de cobai NIH elvețian, NIH/3T3 disponibile de la ATCC ca CRL 1658, celulele COS-1 derivate din rinichii de maimuță disponibile de la ATCC ca CRL 1650 și celulele 293 care sunt celule embrionare renale umane. Celulele preferate provenite de la insecte sunt celulele Sf9 care pot fi transfectate cu vectori de exprimare a baculovirusului. O prezentare generală a opțiunilor de celule-gazdă adecvate poate fi găsită, de exemplu, în manualul scris de Paulina Balbás și Argelia Lorence „Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols”, Partea I, ediția a doua, ISBN 978-1-58829-262-9 și în alte lucrări cunoscute în domeniu.

Transformarea celulelor-gazdă adecvate cu un produs ADN obținut pe baza acestui patent este realizată folosind metode bine cunoscute care depind de obicei de tipul de vector folosit. În ceea ce privește transformarea celulelor-gazdă procariote, vezi, de exemplu, Cohen et al. (1972) și Sambrook et al. (1989). Transformarea celulelor de levuri este descrisă în Sherman et al. (1986). Metoda lui Beggs (1978) este, de asemenea, utilă. Referitor la celulele de la vertebrate, reactivii utili în transferul unor astfel de celule, de exemplu, formule pe bază de fosfat de calciu și DEAE-dextran sau lipozom, sunt disponibili de la Stratagene Cloning Systems sau de la Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD20877, SUA. Electro-permeabilizarea este de asemenea utilă pentru transformarea și/sau transfectarea celulelor și este o metodă bine cunoscută pentru transformarea celulelor provenite din drojdii, bacterii, insecte și a celulelor vertebrate.

Celulele transformate cu succes, adică celulele care conțin o construcție ADN din prezenta invenție, pot fi identificate prin tehnici bine cunoscute, cum este PCR. Alternativ, prezența proteinei în stratul supranatant poate fi detectată folosind anticorpi.

Se va aprecia că anumite celule-gazdă din cadrul descoperirii sunt utile în pregătirea peptidei din descoperire, de exemplu celule de bacterii, de levuri și de insecte. Totuși, și alte celule-gazdă pot fi utile pentru anumite metode terapeutice. De exemplu, celulele prezentatoare de antigen, cum ar fi celulele dendritice, pot fi și ele utile pentru exprimarea peptidelor din descoperire, astfel încât să fie încărcate în moleculele MHC adecvate. Prin urmare, această invenție prezintă o celulă-gazdă, compusă dintr-un acid nucleic, sau un vector de exprimare, conform invenției.

Într-o integrare optimă, celula-gazdă este o celulă prezentatoare de antigen, în particular o celulă dendritică sau o celulă prezentatoare de antigen. Celulele APC încărcate cu o proteină de fuziune recombinantă, care conține fosfatază acidă prostatică (PAP), sunt în prezent în curs de investigare de către U.S. Food and Drug Administration (FDA) la data de 29 aprilie 2010 pentru tratamentul cancerului de prostată asimptomatic sau minim simptomatic (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

Un alt aspect al descoperirii se referă la o metodă de producere a unei peptide sau a variantei sale, metoda cuprinzând cultivarea unei celule-gazdă și izolarea peptidei din celula-gazdă sau din mediul său de cultură.

În altă integrare a peptidei, acidul nucleic sau vectorul de expresie inventat este utilizat în medicină. De exemplu, peptida sau varianta acesteia poate fi pregătită pentru injectare intravenoasă (i.v.), injectare subcutanată (s.c.), injectare intradermică (i.d.), injectare intraperitoneală (i.p.) sau injectare intramusculară (i.m.). Metodele preferate de administrare injectabilă pentru peptidă sunt s.c., i.d., i.p., i.m. și i.v. Metodele preferate de administrare injectabilă pentru ADN sunt i.d., i.m., s.c., i.p. și i.v. Pot fi date doze de peptidă și ADN cuprinse, de exemplu, între 50 μg și 1,5 mg, preferabil între 125 μg și 500 μg, și vor depinde de peptida sau ADN-ul respectiv. Dozele din acest interval au fost utilizate cu succes în studii anterioare (Walter et al., 2012).

Un alt aspect al acestei invenții include o metodă *in vitro* de producere a celulelor T activate, metoda constând în contactarea celulelor T *in vitro* cu molecule MHC umane încărcate cu antigen, exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate, pentru o perioadă de timp suficientă pentru activarea celulelor T într-un mod specific antigenului, antigenul fiind o peptidă conform invenției. Este de preferat să se utilizeze o cantitate suficientă de antigen împreună cu celula prezentatoare a antigenului.

Este de preferat o celulă de mamifer, care are un nivel redus sau inexistent de funcționare ca transportator de peptidă TAP. Printre celulele adecvate, care nu sunt transportatoare de peptidă TAP se numără celulele T2, RMA-S și Drosophila. TAP este transportatorul asociat cu procesarea antigenului.

Linia de celule umane T2 deficiente în încărcarea peptidei este disponibilă de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, având Nr. de catalog CRL 1992; linia de celule Drosophila, linia Schneider 2 este disponibilă de la ATCC cu NR. de catalog CRL 19863; linia de celule RMA-S de șoarece este descrisă în

Karre et al. (Ljunggren și Karre, 1985).

De preferință, înainte de transfectare, celula-gazdă nu exprimă în mod substanțial nicio moleculă MHC de clasă I. Este, de asemenea, de preferat ca celula stimulatoră să exprime o moleculă importantă pentru furnizarea unui semnal de costimulare pentru celule T, cum ar fi oricare dintre B7.1, B7.2, ICAM-1 și LFA3. Secvențele de acid nucleic ale numeroase molecule de MHC de clasă I și ale moleculelor de costimulator sunt disponibile public în bazele de date GenBank și EMBL.

În cazul unui epitop MHC de clasă I utilizat ca antigen, celulele T sunt celule T CD8- pozitive.

Dacă o celulă care prezintă antigen este transfectată pentru a exprima un astfel de epitop, este de preferat ca celula să conțină un vector capabil să exprime peptida care conține SEQ. ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 sau o variantă de secvență aminoacidică a acesteia.

Se pot folosi o serie de alte metode pentru generarea celulelor T *in vitro*. De exemplu, în generarea CTL pot fi folosite limfocite cu infiltrare tumorală autologă. Piebanski et al. (1995) au utilizat limfocite autologă din sânge periferic (PLB) în pregătirea celulelor T. Mai mult, este posibilă producerea de celule T autologă prin pulsarea de celule dendritice cu peptidă sau polipeptidă sau prin infectare cu un virus recombinant. De asemenea, pot fi folosite celule B pentru producerea de celule T autologă. În plus, celule macrofage pulsate cu peptidă sau polipeptidă sau infectate cu virus recombinant pot fi utilizate pentru prepararea de celule T autologă. S. Walter et al., (2003) descriu pregătirea *in vitro* a celulelor T prin utilizarea de celule prezentatoare de antigen artificiale (aAPC-uri), aceasta reprezentând, de asemenea, o modalitate potrivită de generare de celule T pentru peptida aleasă. În prezenta descoperire, aAPC-urile au fost generate prin cuplarea unor complexe de peptide MHC preformate pe suprafața unor particule de polistiren (microgranule) prin biochimie biotină:streptavidină. Acest sistem permite controlul exact al densității MHC pe celulele aAPC, fapt ce permite amplificarea selectivă a răspunsurilor de aviditate ridicată sau scăzută a celulei T specifice antigenului cu eficiență crescută, din probele de sânge. Pe lângă complexe MHC:peptidă, aAPC-urile trebuie să poarte alte proteine cu activitate de costimulare, cum ar fi anticorpi anti-CD28 cuplați pe suprafețele lor. Mai mult, astfel de sisteme bazate pe aAPC-uri necesită adesea adăugarea unor factori solubili adecvați, de exemplu citokine precum interleukina-12.

Pentru pregătirea celulelor T se pot utiliza, de asemenea, celule alogene, iar o metodă este

descrișă detaliat în WO 97/26328. De exemplu, pe lângă celulele de *Drosophila* și celulele T2, se pot utiliza și alte celule pentru prezentarea antigenilor, cum ar fi celule CHO, celule de insecte infectate cu baculovirus, bacterii, levuri, celule-țintă infectate cu vaccin. În plus, pot fi folosiți viruși vegetali (vezi, de exemplu, Porta et al. (1994), care descrie dezvoltarea virusului mozaicului din *Vigna unguiculata*, ca fiind un sistem cu productivitate ridicată pentru prezentarea de peptide străine.)

Celulele T activate, care sunt orientate spre peptidele din invenție, sunt utile în terapie. Astfel, un aspect suplimentar al invenției constă în descrierea celulelor T activate care se pot obține prin metodele anterior menționate în această invenție.

Celulele T activate, care sunt produse de metoda de mai sus, vor recunoaște selectiv o celulă care exprimă aberant o polipeptidă ce conține o secvență de aminoacizi cu SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300.

Este de preferat ca celula T să recunoască celula interacționând prin TCR cu complexul HLA/peptidă (de exemplu, legare). Celulele T sunt utile într-o metodă de distrugere a celulelor țintă la un pacient ale cărui celule țintă exprimă aberant o polipeptidă care conține o secvență de aminoacizi din invenție, atunci când pacientului îi este administrat un număr eficient de celule T activate. Celulele T care sunt administrate pacientului pot fi preluate de la pacient și activate conform descrierii de mai sus (adică sunt celule T autologe). Alternativ, celulele T nu sunt preluate de la pacient, ci de la alt individ. Desigur, este de preferat ca sursa să fie un individ sănătos. Prin „individ sănătos”, inventatorii înțeleg că individul are o stare generală de sănătate bună, de preferat un sistem imunitar puternic și, mai bine, nu suferă de nicio boală care să poată fi testată sau detectată.

In vivo, celulele țintă pentru celulele T CD8-pozitive conform prezentei invenției pot fi celule tumorale (care, uneori, exprimă MHC de clasă II) și/sau celulele stromale care înconjură tumoarea (celule tumorale) (care, uneori, pot și ele exprima MHC de clasă II; (Dengjel et al., 2006)).

Celulele T din prezenta invenție pot fi utilizate ca ingrediente active ale unei compoziții terapeutice. Astfel, descoperire furnizează, de asemenea, o metodă de ucidere a celulelor-țintă la un pacient ale cărui celule țintă exprimă aberant o polipeptidă care conține o secvență de aminoacizi din descoperire, metoda constând în administrarea unui număr eficient de celule T pacientului așa cum s-a arătat mai sus.

Prin „exprimată aberant”, inventatorii înțeleg, de asemenea, că polipeptida este supra-

exprimată în comparație cu nivelurile normale de exprimare sau că gena este silențioasă în țesutul din care este derivă tumoarea, însă în tumoare este exprimată. Prin „supraexprimată” inventatorii înțeleg că polipeptida este prezentă la un nivel de cel puțin 1,2 ori mai mare decât în țesutul normal; de preferat de cel puțin 2 ori și, mai preferabil, de cel puțin 5 ori sau 10 ori mai mare decât nivelul prezent în țesutul normal.

Celulele T pot fi obținute prin metode cunoscute în domeniu, precum cele descrise mai sus.

Protocole pentru acest așa-numit transfer adoptiv de celule T sunt bine cunoscute în domeniu. Recenzii pot fi găsite în: Gattinoni et al. (2006) și Morgan, et al. (2006).

Toate moleculele din această invenție, adică peptida, acidul nucleic, anticorpul, vectorul de exprimare, celula T activată, receptorul celulei T sau acidul nucleic care îl codifică sunt utile pentru tratamentul unor afecțiuni caracterizate de celule care evită un răspuns imunitar. În consecință, orice moleculă din prezenta invenție poate fi utilizată ca medicament sau pentru fabricarea unui medicament. Molecula poate fi utilizată ca atare sau combinată cu altă(e) moleculă(e) din invenție sau cu o moleculă/molecule cunoscută(e).

De preferat, medicamentul din această invenție trebuie să fie sub formă de vaccin. Acesta poate fi administrat direct pacientului, în organul afectat sau administrat pe cale sistemică, i.d., i.m., s.c., i.p. și i.v. sau aplicat *ex vivo* celulelor preluate de la pacient sau unei linii de celule umane care sunt apoi administrate pacientului sau utilizate *in vitro* pentru selectarea unei subpopulații de celule imune derivate de la pacient, care sunt apoi readministrate pacientului. Dacă acidul nucleic este administrat celulelor *in vitro*, poate fi util ca celulele să fie transfectate astfel încât să coexprese citochine imunostimulatoare, cum este interleukina 2. Peptida poate fi substanțial pură sau combinată cu un adjuvant stimulator imun (vezi mai jos) ori poate fi utilizată în combinație cu citokine imunostimulatoare sau poate fi administrată cu un sistem de livrare adecvat, de exemplu lipozomi. De asemenea, peptida poate fi conjugată cu un transportor adecvat, cum ar fi hemocianina melcului *Megathura crenulata* (keyhole limpet hemocyanin, KLH) sau mannan (vezi WO 95/18145). Peptida poate fi, de asemenea, țintită, o proteină de fuziune sau o moleculă hibridă. Se anticipează că peptidele a căror secvență este furnizată în prezenta invenție vor stimula celule T CD4 sau CD8. Cu toate acestea, stimularea celulelor T CD8 este mai eficientă în prezența celulelor T helper CD4. În consecință, pentru epitopii MHC de clasă I care stimulează celulele T CD8, partenerul sau secțiunile de fuziune ale unei molecule hibride furnizează în mod adecvat epitopii care stimulează celule T CD4-pozitive. Epitopii

care stimulează CD4 și CD8 sunt bine-cunoscuți în domeniu și includ pe cei identificați în prezenta invenție.

Într-unul din aspecte, vaccinul cuprinde cel puțin o peptidă care are secvența de aminoacizi de la SEQ ID NO. 1 la SQ ID NO. 300 prezentată și cel puțin o peptidă suplimentară, de preferință două până la 50, mai preferabil două până la 25, chiar mai preferabil două până la 20 și cel mai preferabil două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, doisprezece, treisprezece, paisprezece, cincisprezece, șaisprezece, șaptesprezece sau optsprezece peptide. Peptida(ele) poate (pot) fi preluată(e) din unul sau mai multe TAA specifice și se pot lega de molecule MHC de clasă I.

Într-un alt aspect, vaccinul cuprinde cel puțin o peptidă având secvența de aminoacizi prezentată în SEQ ID NO. 1 până la SEQ ID NO. 300 și cel puțin o peptidă suplimentară, de preferință două până la 50, mai preferabil două până la 25, chiar mai preferabil două până la 20 și cel mai preferabil două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, doisprezece, treisprezece, paisprezece, cincisprezece, șaisprezece, șaptesprezece sau optsprezece peptide. Peptida(ele) poate (pot) fi preluată(e) din unul sau mai multe TAA specifice și se pot lega de molecule MHC de clasă I.

Polinucleotida poate fi substanță pură sau poate fi conținut de un vector sau sistem de livrare adecvat. Acidul nucleic poate fi ADN, ADNc, APN, ARN sau o combinație dintre acestea. Metodele pentru conceperea și introducerea unui astfel de acid nucleic sunt bine cunoscute în domeniu. O prezentare generală este furnizată, de exemplu, de Pascolo et al. (2005). Vaccinurile polinucleotidice sunt ușor de preparat, însă modul de acțiune al acestor vectori în inducerea unui răspuns imunitar nu este pe deplin înțeles. Printre vectorii și sistemele de livrare adecvate se numără ADN-ul și/sau ARN-ul viral, cum ar fi sistemele bazate pe adenovirus, virusul vaccinia, retrovirusuri, adenovirusuri asociate sau hibrizi care conțin elemente din mai multe virusuri. Printre sistemele de livrare nevirale se numără lipide cationice și polimeri cationici, bine cunoscuți în domeniul livrării ADN-ului. Se poate folosi administrarea fizică, cum ar fi cea pe calea unui „pistol genic”. Peptida sau peptidele codificată(e) de acidul nucleic poate (pot) fi o proteină de fuziune, de exemplu cu un epitop care stimulează celulele T pentru celula CDR opusă respectivă, după cum s-a observat mai sus.

Adjuvanții preferați sunt anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamidă, sunitinib, bevacizumab, interferon alfa, oligonucleotide și derivați de CpG, poli(L:C) și derivați, ARN, sildenafil și formulări sub formă de particule cu PLG sau virozomi.

Într-o formulare preferată a compusului farmaceutic conform invenției, adjuvantul este selecționat dintr-un grup care constă din factori stimulatori ai coloniilor, cum ar fi factorul stimulator al coloniilor de granulocite macrofage (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamidă, imiquimod, resiquimod și interferon alfa.

În concretizarea preferată a compusului farmaceutic conform invenției adjuvantul este selecționat dintr-un grup care constă din factori stimulatori ai coloniilor, cum ar fi factorul stimulator al coloniilor de granulocite macrofage (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamidă, imiquimod și resiquimod. În formularea preferată a compusului farmaceutic conform invenției, adjuvantul este ciclofosfamidă, imiquimod sau resiquimod. Adjuvanții și mai preferați sunt Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC (Hiltonol®) și anti-CD40 mAB sau combinații ale acestora.

Această compoziție este folosită pentru administrare parenterală, cum ar fi subcutanată, intradermică, intramusculară sau orală. Pentru aceasta, peptidele și opțional alte molecule sunt dizolvate sau în suspensie într-un mediu de transport (transportor) farmacologic acceptabil, preferabil apos. În plus, compoziția poate conține excipienți, cum ar fi tampoane, agenți de legare, agenți explozivi, diluanți, arome, lubrifianți etc. Peptidele pot fi, de asemenea, administrate împreună cu substanțe care stimulează imunitatea, cum ar fi citokinele. Lista exhaustivă de excipienți care se pot folosi în această compoziție poate fi preluată, de exemplu, din A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed., 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press. Compoziția poate fi folosită pentru prevenirea, profilaxia și/sau tratamentul bolilor adenomatoase sau canceroase. Exemple de formule pot fi găsite, de exemplu, în EP2113253.

Prezenta invenție furnizează un medicament util în tratarea cancerului, în special HCC și alte afecțiuni maligne.

Prezenta invenție mai include un kit care cuprinde:

- (a) un recipient conținând o compoziție farmaceutică conform descrierii de mai sus, în soluție sau în formă liofilizată;
- (b) opțional, un al doilea recipient care conține un diluant sau o soluție de reconstituire pentru formula liofilizată; și
- (c) opțional, instrucțiuni pentru (i) utilizarea soluției sau (ii) reconstituirea și/sau utilizarea

formulei liofilizate.

Trusa poate conține suplimentar și una sau mai multe din următoarele: (iii) soluție tampon, (iv) dizolvant, (v) filtru, (vi) ac sau (vii) seringă. Recipientul este, preferabil, o sticlă, o fiolă, o seringă sau o eprubetă, și poate fi un recipient reutilizabil. Compusul farmacologic este, preferabil, liofilizat.

Trusele din prezentul brevet vor conține, preferabil, formula liofilizată care face obiectul prezentului brevet într-un recipient adecvat și instrucțiunile pentru reconstituirea și/sau utilizarea acesteia. Recipientele adecvate includ, de exemplu, sticle, fiole (de exemplu fiole dublu compartimentate), seringi (cum ar fi seringile dublu-compartimentate) și eprubete. Recipientul poate fi construit dintr-o varietate de materiale, de exemplu sticlă sau plastic. Preferabil, trusa și/sau recipientul conțin instrucțiuni privind (sau asociate cu) recipientul, care prezintă instrucțiunile de reconstituire și/sau administrare. De exemplu, eticheta poate indica dacă formula liofilizată trebuie reconstituită la o concentrație a peptidelor descrisă anterior. În plus eticheta poate indica dacă formula este utilizabilă sau destinată pentru administrarea subcutanată.

Recipientul care conține formula poate fi o fiolă pentru utilizări multiple, care permite administrarea repetată (de exemplu, 2-6 administrări) a formulei reconstituite. Trusa poate include în plus și un al doilea recipient care conține un dizolvant adecvat (de exemplu, soluție de bicarbonat de sodiu).

La amestecarea dizolvantului cu formula liofilizată, concentrația finală de peptide în formula reconstituită este preferabil de cel puțin 0,15 mg/ml/peptidă (=75 μ g) și preferabil nu depășește 3 mg/ml/peptidă (=1500 μ g). În plus trusa poate include și alte materiale necesare din punct de vedere comercial și al utilizării, inclusiv alte soluții tampon, alți dizolvanți, filtre, ace, seringi și pliante cu instrucțiuni de utilizare.

Trusele din prezentul brevet pot prezenta un singur recipient care conține formula compusului farmacologic conform cu prezentul brevet, cu sau fără alte componente (de exemplu alți compuși sau alte formule farmacologice ale acestor alți compuși) sau pot prezenta câte un recipient distinct pentru fiecare compus.

Preferabil, trusele din invenție includ o formă de condiționare care face obiectul brevetului ambalată pentru utilizarea în combinație cu coadministrarea cu un al doilea compus (cum ar fi adjuvanți (de exemplu GM-CSF, agent chimioterapeutic, produs natural, hormon sau antagonist, agent antiangiogenetic sau inhibitor de angiogeneză, agent inductor de

apoptoză sau chelator) sau cu un compus farmacologic al acestora. Componentele trusei pot fi pre-amestecate sau fiecare componentă poate fi într-un recipient separat, distinct, înainte de administrarea către pacient. Componentele trusei se pot furniza în una sau mai multe soluții lichide, preferabil soluții apoase, și în mod ideal ca soluții apoase sterile. Componentele trusei pot fi furnizate de asemenea și în stare solidă, care se poate converti în stare lichidă prin adăugarea solvenților adecvați, care se vor furniza preferabil într-un recipient distinct.

Recipientul unei truse terapeutice poate fi fiolă, eprubetă, flacon, sticlă, seringă sau orice altă formă de depozitare a unui solid sau lichid. De obicei, dacă este vorba de mai mult de un singur component, trusa va include și o a doua fiolă sau un alt recipient, care permite dozarea separată. Trusa poate include și un alt recipient pentru un lichid farmacologic acceptabil. Preferabil, trusa terapeutică va include și un sistem (de exemplu unul sau mai multe ace, seringi, picurătoare pentru ochi, pipete etc.) care permit administrarea agenților care fac obiectul invenției și care intră în componența trusei.

Formula prezentă este una adecvată pentru administrarea peptidelor pe o cale de administrare acceptabilă, cum ar fi orală (enterală), nazală, oftalmică, subcutanată, intradermică, intramusculară, intravenoasă sau transdermică. Preferabil, administrarea va fi subcutanată și, cel mai preferabil, intradermică. Administrarea se poate face prin injectomat.

Deoarece peptidele din invenție sunt izolate din HCC, medicamentul din invenție este folosit de preferință pentru tratarea HCC.

Este important de înțeles că răspunsul imunitar declanșat de vaccin în conformitate cu invenția atacă cancerul în diferite stadii celulare și în diferite stadii de dezvoltare. Mai mult, sunt atacate diferite căi de semnalizare asociate cancerului. Acesta este un avantaj față de vaccinurile care vizează doar una sau câteva ținte, ceea ce poate determina adaptarea ușoară a tumorii la atac (evadare a tumorii). Mai mult, nu toate tumorile individuale exprimă același model de antigeni. Prin urmare, o combinație de mai multe peptide asociate tumorii asigură faptul că fiecare tumoră poartă cel puțin unele dintre ținte. Compoziția a fost special concepută astfel încât fiecare tumoră HLA-A*02-pozitivă și/sau HLA-A*24-pozitivă este de așteptat să exprime mai multe dintre antigene și să acopere mai multe căi independente necesare pentru creșterea și menținerea tumorii. Pentru fiecare dintre subseturile peptidice specifice celor două alele HLA de clasă I (A*02 și A*24), acest lucru este asigurat în mod independent pe baza analizelor experimentale subiacente. Astfel,

vaccinul poate fi „de uz general” pentru o populație mai mare de pacienți. Acest lucru înseamnă că o preselectare a pacienților care urmează să fie tratați cu vaccinul poate fi restricționată la tiparea HLA, nu necesită evaluări suplimentare ale biomarkerului pentru exprimarea antigenului, dar este totuși asigurat că mai multe ținte sunt atacate simultan de răspunsul imunitar indus, ceea ce este important pentru eficacitate (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

În figuri,

Figura 1 prezintă supraprezentarea diferitelor peptide din țesuturi normale (gri închis) și HCC (gri deschis). Figura 1A) APOB, Peptidă: ALVDTLK FV (A*02) (SEQ ID NO. 7), țesuturi de la stânga la dreapta: 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 2 artere, 2 măduve osoase, 7 creiere, 3 sâni, 13 colonuri, 4 esofage, 2 vezici biliare, 3 tracturi GI, 3 inimi, 16 rinichi, 4 probe de leucocite, 45 plămâni, 1 ganglion, 1 ovar, 7 pancreasuri, 1 nerv periferic, 1 glandă hipofizară, 3 pleure, 1 prostată, 6 recturi, 3 mușchi scheletici, 1 membrană seroasă, 3 piei, 4 spline, 7 stomacuri, 1 testicul, 2 timusuri, 3 glande tiroide, 2 utere, 2 vene și 20 ficiți; Figura 1B) ALDH1L1, Peptidă: KLQAGTVFV (A*02) (SEQ ID NO. 2), țesuturi de la stânga la dreapta: 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 2 artere, 2 măduve osoase, 7 creiere, 3 sâni, 13 colonuri, 4 esofage, 2 vezici biliare, 3 tracturi GI, 3 inimi, 16 rinichi, 4 probe de leucocite, 45 plămâni, 1 ganglion, 1 ovar, 7 pancreasuri, 1 nerv periferic, 1 glandă hipofizară, 3 pleure, 1 prostată, 6 recturi, 3 mușchi scheletici, 1 membrană seroasă, 3 piei, 4 spline, 7 stomacuri, 1 testicul, 2 timusuri, 3 glande tiroide, 2 utere, 2 vene și 20 ficiți; Figura 1C) C8B, Peptidă: AYLLQPSQF (A*24) (SEQ ID NO. 200), țesuturi de la stânga la dreapta: inclusiv 2 glande suprarenale, 1 arteră, 4 creiere, 1 sân, 5 colonuri, 1 inimă, 13 rinichi, 9 plămâni, 3 pancreasuri, 2 recturi, 3 piei, 1 splină, 12 stomacuri, 1 timus, 2 utere și 9 ficiți; Figura 1D) RAD23B, Peptidă: KIDEKNFVV (SEQ ID NO. 63) 1 membrană seroasă, 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 2 artere, 2 măduve osoase, 7 creiere, 3 sâni, 13 coloane, 2 vezici biliare, 3 tracturi GI, 3 inimi, 12 rinichi, 4 leucocite, 19 ficiți, 43 plămâni, 1 ganglion limfatic, 1 ovar, 6 pancreasuri, 1 nerv periferic, 1 glandă hipofizară, 3 pleure, 1 prostată, 6 recturi, 3 mușchi scheletici, 3 piei, 4 spline, 5 stomacuri, 1 testicul, 2 timusuri 3 glande tiroide, 2 utere, 2 vene, 4 esofage; Figura 1E) RAD23B, Peptidă: KIDEKNFVV (SEQ ID NO. 63). Sunt arătate doar probe pe care a fost prezentată peptida: 63) 5 linii celulare, 1 țesut normal (1 glandă suprarenală), 16 țesuturi canceroase (2 cancere cerebrale, 4 cancere hepatice, 5 cancere pulmonare, 1 cancer rectal, 1 cancer de vezică urinară, 3 cancere uterine) (de la stânga la dreapta); Figura 1F) RFNG RLPPDTLLQQV (SEQ ID NO. 92). Sunt arătate doar probe pe care a fost prezentată peptida: 1

membrană seroasă, 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 2 artere, 2 măduve osoase, 7 creiere, 3 sâni, 13 coloane, 2 vezici biliare, 3 tracturi GI, 3 inimi, 12 rinichi, 4 leucocite, 19 fici, 43 plămâni, 1 ganglion limfatic, 1 ovar, 6 pancreasuri, 1 nerv periferic, 1 glandă hipofizară, 3 pleure, 1 prostată, 6 recturi, 3 mușchi scheletici, 3 piei, 4 spline, 5 stomacuri, 1 testicul, 2 timusuri 3 glande tiroide, 2 utere, 2 vene, 4 esofage; Figura 1G) RFNG, Peptidă: RLPPDTLLQQV (SEQ ID NO. 92). Sunt arătate doar probe pe care a fost prezentată peptida: 2 linii celulare, 2 țesuturi normale (2 glande suprarenale), 17 țesuturi canceroase (1 cancer cerebral, 1 cancer mamar, 1 cancer esofagian, 5 cancere hepatice, 4 cancere pulmonare, 1 cancer ovarian, 1 cancer de prostată, 2 cancere ale vezicii urinare, 1 cancer uterin (de la stânga la dreapta); Figura 1H) FLVCR1, Peptidă: SVWFGPKEV (SEQ ID NO. 104) 1 membrană seroasă, 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 2 artere, 2 măduve osoase, 7 creiere, 3 sâni, 13 coloane, 2 vezici biliare, 3 tracturi GI, 3 inimi, 12 rinichi, 4 leucocite, 19 fici, 43 plămâni, 1 ganglion limfatic, 1 ovar, 6 pancreasuri, 1 nerv periferic, 1 glandă hipofizară, 3 pleure, 1 prostată, 6 recturi, 3 mușchi scheletici, 3 piei, 4 spline, 5 stomacuri, 1 testicul, 2 timusuri 3 glande tiroide, 2 utere, 2 vene, 4 esofage; Figura 1I) FLVCR1, Peptidă: SVWFGPKEV (SEQ ID NO. 104). Sunt arătate doar probe pe care a fost prezentată peptida: 9 linii celulare, 1 țesut normal (1 intestin subțire), 16 țesuturi canceroase (1 cancer cerebral, 1 cancer mamar, 5 cancere hepatice, 5 cancere pulmonare, 1 cancer de piele, 1 cancer de stomac, 1 cancer de vezică urinară, 1 cancer uterin) (de la stânga la dreapta); Figura 1J) IKBKAP, Peptidă: LLFPHPVNQV (SEQ ID NO. 156) 1 membrană seroasă, 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 2 artere, 2 măduve osoase, 7 creiere, 3 sâni, 13 coloane, 2 vezici biliare, 3 tracturi GI, 3 inimi, 12 rinichi, 4 leucocite, 19 fici, 43 plămâni, 1 ganglion limfatic, 1 ovar, 6 pancreasuri, 1 nerv periferic, 1 glandă hipofizară, 3 pleure, 1 prostată, 6 recturi, 3 mușchi scheletici, 3 piei, 4 spline, 5 stomacuri, 1 testicul, 2 timusuri 3 glande tiroide, 2 utere, 2 vene, 4 esofage; Figura 1K) IKBKAP, Peptidă: LLFPHPVNQV (SEQ ID NO. 156). Sunt arătate doar probe pe care a fost prezentată peptida: 7 linii celulare, 2 culturi primare, 1 țesut normal (1 colon), 34 țesuturi canceroase (1 cancer de măduvă osoasă, 1 cancer mamar, 1 cancer de colon, 2 cancere esofagiene, 2 cancere de leucemie leucocitară, 4 cancere hepatice, 11 cancere pulmonare, 3 cancere de ganglioni limfatici, 5 cancere ovariene, 4 cancere ale vezicii urinare) (de la stânga la dreapta); Figura 1L) NKD1, Peptidă: FLDTPIAKV (SEQ ID NO. 47), 1 membrană seroasă, 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 2 artere, 2 măduve osoase, 7 creiere, 3 sâni, 13 colonuri, 2 vezici biliare, 3 tracturi GI, 3 inimi, 12 rinichi, 4 leucocite, 19 fici, 43 plămâni, 1 ganglion limfatic, 1 ovar, 6 pancreasuri, 1 nerv periferic, 1 glandă hipofizară, 3 pleure, 1 prostată, 6 recturi, 3 mușchi scheletici, 3 piei, 4 spline, 5 stomacuri, 1 testicul, 2 timusuri 3 glande tiroide, 2 utere, 2 vene, 4 esofage; Figura 1M) NKD1, Peptidă: FLDTPIAKV (SEQ ID NO. 47). Sunt arătate doar probe pe care a fost prezentată peptida: 1 altă boală, 2 țesuturi normale (1 plămân, 1 splină), 35 țesuturi canceroase (5 cancere cerebrale,

6 cancere de colon, 1 cancer esofagian, 6 cancere hepatice, 9 cancere pulmonare, 1 cancer ovarian, 1 cancer de prostată, 4 cancer rectale, 2 cancere stomacale) (de la stânga la dreapta).

Figura 2 arată exemple de profiluri de exprimare (exprimare relativă comparativ cu rinichi normal) ale genelor-sursă din prezenta invenție care sunt foarte supraexprimate sau exprimate exclusiv în HCC într-un panel de țesuturi normale (gri închis) și 12 probe de HCC (gri). Figura 2A) APOB, țesuturi de la stânga la dreapta: 1 glandă suprarenală, 1 arteră, 1 măduvă osoasă, 1 creier (întreg), 1 sân, 1 colon, 1 esofag, 1 inimă, 3 rinichi, 1 probă de leucocite, 1 ficat, 1 plămân, 1 nodul limfatic, 1 ovar, 1 pancreas, 1 placentă, 1 prostată, 1 glandă salivară, 1 mușchi scheletic, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 testicul, 1 timus, 1 glandă tiroidă, 1 vezică urinară, 1 col uterin, 1 uter, 1 venă; Figura 2B) AMACR, țesuturi de la stânga la dreapta: 1 glandă suprarenală, 1 arteră, 1 măduvă osoasă, 1 creier (întreg), 1 sân, 1 colon, 1 esofag, 1 inimă, 3 rinichi, 1 probă de leucocite, 1 ficat, 1 plămân, 1 nodul limfatic, 1 ovar, 1 pancreas, 1 placentă, 1 prostată, 1 glandă salivară, 1 mușchi scheletic, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 testicul, 1 timus, 1 glandă tiroidă, 1 vezică urinară, 1 col uterin, 1 uter, 1 venă; Figura 2C) ALDH1L1, țesuturi de la stânga la dreapta: 1 glandă suprarenală, 1 arteră, 1 măduvă osoasă, 1 creier (întreg), 1 sân, 1 colon, 1 esofag, 1 inimă, 3 rinichi, 1 probă de leucocite, 1 ficat, 1 plămân, 1 nodul limfatic, 1 ovar, 1 pancreas, 1 placentă, 1 prostată, 1 glandă salivară, 1 mușchi scheletic, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 testicul, 1 timus, 1 glandă tiroidă, 1 vezică urinară, 1 col uterin, 1 uter, 1 venă; Figura 2D) FGG, țesuturi de la stânga la dreapta: 1 glandă suprarenală, 1 arteră, 1 măduvă osoasă, 1 creier (întreg), 1 sân, 1 colon, 1 esofag, 1 inimă, 3 rinichi, 1 probă de leucocite, 1 ficat, 1 plămân, 1 nodul limfatic, 1 ovar, 1 pancreas, 1 placentă, 1 prostată, 1 glandă salivară, 1 mușchi scheletic, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 testicul, 1 timus, 1 glandă tiroidă, 1 vezică urinară, 1 col uterin, 1 uter, 1 venă; Figura 2E) C8B, țesuturi de la stânga la dreapta: 1 glandă suprarenală, 1 arteră, 1 măduvă osoasă, 1 creier (întreg), 1 sân, 1 colon, 1 esofag, 1 inimă, 3 rinichi, 1 probă de leucocite, 1 ficat, 1 plămân, 1 nodul limfatic, 1 ovar, 1 pancreas, 1 placentă, 1 prostată, 1 glandă salivară, 1 mușchi scheletic, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 testicul, 1 timus, 1 glandă tiroidă, 1 vezică urinară, 1 col uterin, 1 uter, 1 venă; și Figura 2F) HSD17B6, țesuturi de la stânga la dreapta: inclusiv 1 glandă suprarenală, 1 arteră, 1 măduvă osoasă, 1 creier (întreg), 1 sân, 1 colon, 1 esofag, 1 inimă, 3 rinichi, 1 probă de leucocite, 1 ficat, 1 plămân, 1 nodul limfatic, 1 ovar, 1 pancreas, 1 placentă, 1 prostată, 1 glandă salivară, 1 mușchi scheletic, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 testicul, 1 timus, 1 glandă tiroidiană, 1 vezică urinară, 1 col uterin, 1 uter și 1 venă.

Figura 3 prezintă exemple de rezultate ale citometriei în flux după colorarea multimerică specifică peptidelor. Pentru explicații suplimentare, consultați Exemplul 4.

Figura 4 arată exemple de rezultate ale citometriei în flux după colorarea multimerică specifică peptidelor. Pentru explicații suplimentare, consultați Exemplul 4.

EXEMPLE

EXEMPLUL 1: Identificarea și cuantificarea peptidelor asociate tumorii prezentate pe suprafața celulară

Probe de țesut

Țesuturile tumorale de la pacienți au fost obținute de la Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Tübingen, Germania; Istituto Nazionale Tumori „Pascale”. Molecular Biology and Viral Oncology Unit, Via Mariano, Naples, Italia; BioOptions Inc., Brea, CA, SUA; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, SUA; Asterand Europe, Royston Herts, Regatul Unit. Consimțămintele informate scrise ale pacienților au fost obținute înainte de intervențiile chirurgicale. Țesuturile au fost congelate rapid imediat după intervenția chirurgicală și stocate până la izolarea TUMAP la -70°C sau temperaturi mai joase.

Izolarea peptidelor HLA din probe de țesut

Seturile de peptide HLA din probe de țesut congelate rapid au fost obținute prin precipitare imună din țesuturi solide conform unui protocol ușor modificat (Falk, K., 1991; Seeger, F.H.T., 1999) folosindu-se anticorpul HLA-A*02-specific BB7.2, anticorpul HLA-A, -B, -C-specific W6/32, sefaroză CNBr-activată, tratament cu acid și ultrafiltrare.

Analize prin spectrometrie de masă

Seturile de peptide HLA obținute au fost separate în funcție de hidrofobie prin cromatografie în fază inversă (sistem nanoAcquity UPLC, Waters), iar peptidele eluate au fost analizate în spectrometre de masă hibride LTQ-velos și cu fuziune (ThermoElectron) echipate cu o sursă ESI. Seturile de peptide au fost încărcate direct în coloana de analiză microcapilară cu siliciu infuzat (75 μm i.d. x 250 mm) prevăzută cu material în fază inversă C18, de 1,7 μm (Waters) cu aplicarea unui debit de 400 nl pe minut. Apoi, peptidele au fost separate cu ajutorul unui gradient binar de 180 minute în două trepte, de la 10% la 33% B la un debit de 300 nl pe minut. Gradientul a fost compus din solvent A (0,1% acid formic în apă) și solvent B (0,1% acid formic în acetonitril). Un capilar din sticlă aurită (PicoTip, New Objective) a fost utilizat pentru introducerea în sursa nanoESI.

Spectrometrele de masă LTQ-Orbitrap au fost operate în modul dependent de date folosindu-se o strategie TOP5. Pe scurt, un ciclu de scanare a fost inițiat cu o scanare completă de mare precizie masică în orbitrap ($R = 30.000$), urmată de scanări MS/MS tot în orbitrap ($R = 7500$) pe cele mai abundente 5 ioni precursori cu excluderea dinamică a ionilor selectați anterior. Spectrul de masă tandem a fost interpretat de SEQUEST și alte controale manuale. Secvența peptidică identificată a fost asigurată prin compararea modelului de fragmentare a peptidei naturale generat cu modelul de fragmentare a peptidei sintetice de referință, cu secvență identică.

Cuantificarea LC-MS relativă fără etichete a fost efectuată prin numărarea ionilor, adică prin extracție și analiză a caracteristicilor LC-MS (Mueller et al. 2007a). Metoda presupune că zona de semnal LC-MS a peptidei se corelează cu abundența sa în probă. Caracteristicile extrase au fost prelucrate APOI prin deconvoluția de stare a încărcării și alinierea timpului de retenție (Mueller et al., 2007b; Sturm et al., 2008). În final, toate caracteristicile LC-MS au fost referențiate încrucișat cu rezultatele identificării secvenței pentru a combina datele cantitative ale diferitelor probe și țesuturi cu profilurile de prezentare ale peptidelor. Datele cantitative au fost normalizate pe două niveluri în funcție de tendința centrală pentru a ține cont de variațiile în cadrul replicilor tehnice și biologice. Astfel, fiecare peptidă identificată poate fi asociată cu date cantitative care permit cuantificarea relativă între probe și țesuturi. În plus, toate datele cantitative obținute pentru candidații peptidici au fost inspectate manual pentru a se asigura consecvența datelor și a se verifica acuratețea analizei automate. Pentru fiecare peptidă a fost calculat un profil de prezentare care arată prezentarea medie a probei, precum și variațiile replicilor. Profilurile juxtapun probe de HCC cu o referință de probe de țesut normal.

Profilurile de prezentare ale peptidelor exemplificate supraprezentate sunt prezentate în Figura 1. Scorurile de prezentare pentru exemple de peptide sunt prezentate în Tabelul 6.

Tabelul 6: Scoruri de prezentare. Tabelul prezintă peptide care sunt extrem de supraprezentate pe tumori în comparație cu un panel de țesuturi normale (+++), foarte supraprezentate pe tumori în comparație cu un panou de țesuturi normale (++) sau supraprezentate pe tumori în comparație cu un panel de țesuturi normale (+). S* = fosfoserină

SEQ ID NO.	Secvență	Prezentare a peptidei
47	FLDTPIAKV	+

EXEMPLUL 2

Profilarea exprimării genelor care codifică peptidele din descoperire

Supraprezentarea sau prezentarea specifică a unei peptide pe celule tumorale în comparație cu celule normale este suficientă pentru utilitatea sa în imunoterapie, iar unele peptide sunt specifice tumorii în pofida proteinei-sursă care apare și în țesuturile normale. Totuși, profilarea exprimării ARNm adaugă un nivel suplimentar de siguranță în selectarea țintelor peptidice pentru imunoterapii. În special pentru opțiunile terapeutice cu riscuri mari de siguranță, cum ar fi TCR-urile maturizate în funcție de afinitate, peptida-țintă ideală va fi derivată dintr-o proteină care este unică pentru tumoare și care nu se găsește pe țesuturi normale.

Surse de ARN și pregătirea acestora

Eșantioanele de țesut prelevate chirurgical au fost furnizate așa cum este indicat mai sus (vezi Exemplul 1) după obținerea consimțământului informat scris de la fiecare pacient. Probele de țesut tumoral au fost înghețate instantaneu imediat după intervenția chirurgicală și au fost ulterior omogenizate cu mojar și pistil sub azot lichid. ARN-ul total a fost preparat din aceste probe, utilizându-se reactiv TRI (Ambion, Darmstadt, Germania), urmat de o curățare cu RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germania); ambele metode au fost executate conform protocolului producătorului.

ARN-ul total din țesuturi umane sănătoase a fost obținut comercial (Ambion, Huntingdon, Regatul Unit; Clontech, Heidelberg, Germania; Stratagene, Amsterdam, Țările de Jos; BioChain, Hayward, CA, SUA). ARN-ul de la mai mulți indivizi (între 2 și 123 indivizi) a fost combinat astfel încât ARN-ul fiecărui individ să fie ponderat în mod egal.

Calitatea și cantitatea tuturor probelor de ARN au fost evaluate printr-un bioanalizor Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Germania) cu trusă RNA 6000 Pico LabChip (Agilent).

Experimente în micromatrice

Analiza expresiei genomului tuturor probelor de ARN din țesut tumoral și normal a fost efectuată cu micromatrice de oligonucleotide Affymetrix Human Genome (HG) U133A sau HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, SUA). Toate etapele au fost urmate în conformitate cu manualul Affymetrix. Pe scurt, ADNc cu dublu-helix a fost sintetizat din 5-8 μg ARN total, folosindu-se SuperScript RTII (Invitrogen) și primerul oligo-dT-T7

(MWG Biotech, Ebersberg, Germania) conform descoperirii din manual. Transcrierea *in vitro* a fost efectuată cu o trusă BioArray High Yield RNA Transcript Labelling (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, SUA) pentru matricele U133A sau cu o trusă GeneChip IVT Labelling (Affymetrix) pentru matricele U133 Plus 2.0, urmată de fragmentarea ARNc, hibridizare și colorare cu streptavidină-ficoeritrină și anticorp anti-streptavidină biotinitat (Molecular Probes, Leiden, Țările de Jos). Imaginile au fost scanate cu Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) sau cu Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), iar datele au fost analizate cu software-ul GCOS (Affymetrix), folosindu-se setările implicite pentru toți parametrii. Pentru normalizare au fost folosite 100 gene auxiliare furnizate de Affymetrix. Valorile exprimărilor relative au fost calculate pe baza rapoartelor jurnalelor de semnal furnizate de software, iar proba de rinichi normal a fost stabilită arbitrar la 1,0. Exemplele de profiluri de exprimare ale genelor-sursă din prezenta descoperire care sunt puternic supraexprimate sau exprimate exclusiv în HCC sunt prezentate în Figura 2. Scorurile de exprimare pentru alte exemple de gene sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7: Scoruri de exprimare. Tabelul prezintă peptide din gene necorelate cu invenția care sunt extrem de supraexprimate pe tumori în comparație cu un panel de țesuturi normale (+++), foarte supraexprimate pe tumori în comparație cu un panou de țesuturi normale (++) sau supraexprimate pe tumori în comparație cu un panel de țesuturi normale (+).

SEQ ID NO.	Secvență	Exprimare genă
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	++
3	ILDDNMQKL	+
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++
7	ALVDTLKfV	+++
10	SLLEEFDFHV	+
13	GLIDTETAMKAV	+++
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLNSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
31	YQMDIQQEL	+++
38	ALADVVEHA	+
39	ALDPKANFST	+
41	ALLELDEPLVL	+++

SEQ ID NO.	Secvență	Exprimare genă
42	ALLGGNVRMML	+
44	ALQDAIRQL	+
45	ALQDQLVLV	++
46	AMAEMKVVL	++
48	FLLEQPEIQV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
50	FTIPKLYQL	+++
52	GLFNAELLEA	+++
53	GLIHLEGDTV	+++
55	GLYGRTIEL	+++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	+
66	KLHEEIDRV	+++
67	KLKETIQKL	+++
68	KLLAATVLLL	+++
73	KLTLVIISV	+++
74	KLYDLELIV	+++
76	LLADIGGDPFAA	+
81	NLASFIEQVAV	+
82	NVFDGLVRV	+++
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	++
87	RLFEENDVNL	+++
90	RLLDVLAPLV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+
95	SICNGVPMV	++
97	SLLPQLIEV	+++
100	SLVGDIGNVNM	+++
103	SMGDHLWVA	+
105	SVYDGKLLI	+
106	TLAAIIHGA	++
107	TLGQFYQEV	+++
109	TLYALSHAV	+++
110	TVGGSEILFEV	+++
113	VLMDKLVEL	+++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	++
117	YAFPKSITV	+
119	YLDKNLTVSV	++
120	YLGEYVKA	+++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	+++

SEQ ID NO.	Secvență	Exprimare genă
129	SQADVIPAV	++
130	ALDAGAVYTL	++
132	ALHEEVVGV	++
141	AMGEKSFSV	+
142	AVIGGLIYV	+++
145	FLIAEYFEHV	++
146	FLWTEQAHTV	++
148	GLFAPLVFL	+
149	GLLSGLDIMEV	+++
154	KLTDHLKYV	+++
157	QLLPNLRAV	+
158	RIISGLVKV	++
160	RLLAKIICL	+++
163	RLTESVLYL	++
165	RVIEHVEQV	++
168	SLAVLVPIV	+++
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
175	TLFEHLPHI	++
177	VLDEPYEKV	++
182	YLLHFPMAL	+++
183	YLYNNEEQVGL	+++
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+
200	AYLLQPSQF	+++
204	KYRLTYAYF	+++
206	KWPETPLLL	+
215	IYTGNISF	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAIRQI	+++
228	YLITSVELL	+
233	ALLGKLDAI	+
249	LLLGERVAL	+
255	SLFGQDVKAV	+
259	TLITDGMRSV	+
263	VLPSLKEI	+
273	AILETAPKEV	+
275	ALIEGAGILL	+
286	KVLDKVFRA	+
296	SLLSGRISTL	+
298	TMAKESSIIGV	+
301	VLADFGARV	++
302	KIQEILTQV	+

SEQ ID NO.	Secvență	Exprimare genă
315	KVLDGSPIEV	++
318	KLNEINEKI	+++
320	GLADNTVIAKV	+
324	RLFETKITQV	++
327	GLNEEIARV	+
336	YLPTFFLTV	+
341	YLAIGIHEL	++
345	SYNPLWLRI (A*24)	++

EXEMPLUL 3: Schimb UV-ligand/Legare a peptidei la HLA-A*02 și HLA-A*24

Peptidele candidate pentru terapii bazate pe celule T în conformitate cu prezenta descoperire au fost testate în continuare în privința capacității lor de legare la MHC (afinitate). Complexele peptidă-MHC individuale au fost produse prin schimb UV-ligand, unde o peptidă sensibilă la UV este scindată la iradiere UV și schimbată cu peptida de interes, așa cum a fost analizată. Doar candidații peptidici care se pot lega și stabiliza în mod eficient moleculele de MHC receptive la peptide împiedică disocierea complexelor MHC. Pentru a determina randamentul reacției de schimb, a fost efectuat un ELISA bazat pe detectarea lanțului ușor ($\beta 2m$) al complexelor MHC stabilizate. Testul a fost efectuat așa cum este descris cu caracter general în Rodenko et al. (Rodenko et al., 2006).

Plăci de 96 de godeuri MAXISorp (NUNC) au fost acoperite peste noapte cu 2 $\mu\text{g/ml}$ streptavidină în PBS la temperatura camerei, au fost spălate de 4 ori și au fost blocate pentru 1 oră la 37°C în 2% BSA care conținea tamponul de blocare. Monomerii HLA-A*0201/MLA-001 reasamblați au servit ca standarde, acoperind domeniul 15-500 ng/ml. Monomerii peptidă-MHC ai reacției de schimb UV au fost diluați de 100 de ori în tampon de blocare. Probele au fost incubate timp de 1 oră la 37°C, au fost spălate de patru ori, au fost incubate cu 2 $\mu\text{g/ml}$ de anti- $\beta 2m$ HRP conjugat timp de 1 oră la 37°C, au fost spălate din nou și au fost detectat cu soluția TMB stopată cu NH_2SO_4 . Absorbția a fost măsurată la 450 nm. Peptidele candidate care prezintă un randament de schimb mare (preferabil mai mare de 50%, cele mai preferabil mai mare de 75%) sunt, în general, preferate pentru o generare și producție de anticorpi sau fragmente ale acestora și/sau receptori de celule T sau fragmente ale acestora, deoarece arată suficientă aviditate la molecule de MHC și împiedică disocierea complexelor MHC.

Tabelul 8: Scoruri de legare MHC clasă I

Legarea peptidelor restricționate HLA de clasă I la HLA-A*02 sau HLA-A*24 în funcție de secvența peptidică a fost clasificată prin randamentul schimbului peptidic: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; ≥ 50 = +++; $\geq 75\%$ = +++. S* = fosfoserină.

SEQ ID	Secvență	Schimb de peptide
47	FLDTPIAKV	"++"

EXEMPLUL 4

Imunogenitatea *in vitro* pentru peptide prezentate MHC de clasă I

Pentru a obține informații cu privire la imunogenitatea TUMAP-urilor din prezenta invenție, inventatorii au efectuat investigații utilizând un test *in vitro* de amorsare a celulelor T pe baza stimulărilor repetate de celule T CD8⁺ cu celule care prezintă un antigen artificial (aAPC-uri) încărcate cu complexe de peptide/MHC și anticorp anti-CD28. Astfel inventatorii au putut arăta imunogenitatea pentru 22 TUMAP-uri restricționate de HLA-A*0201 în conformitate cu descoperirea până în prezent, demonstrând că aceste peptide sunt epitopi ai celulelor T împotriva cărora există celule T precursorare CD8⁺ la oameni.

Stimularea *in vitro* a celulelor T CD8⁺

Pentru a efectua stimulări *in vitro* de către celule prezentatoare de antigen artificiale încărcate cu complex peptidă-MHC (pMHC) și anticorp anti-CD28, inventatorii au izolat mai întâi celule T CD8⁺ din produse de leucafereză HLA-A*02 proaspete prin selectare pozitivă utilizând microgranule CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germania) de la donatori sănătoși, obținute de la University Clinics Mannheim, Germania, după consimțământ informat.

PBMC-urile și limfocitele CD8⁺ izolate au fost incubate până la utilizare în mediu de celule T (TCM) constând din RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Germania) suplimentat cu ser AB uman inactivat la căldură 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, 100 U/ml penicilină/100 μg/ml streptomycină (Cambrex, Köln, Germania), 1 mM piruvat de sodiu (CC Pro, Oberdorla, Germania), 20 μg/ml gentamicină (Cambrex). În această etapă s-au adăugat, de asemenea, la TCM 2,5 ng/ml IL-7 (PromoCell, Heidelberg, Germania) și 10 U/ml IL-2 (Novartis Pharma, Nürnberg, Germania).

Generarea granulelor acoperite cu pMHC/anti-CD28, stimularea celulelor T și citirea au fost realizate într-un sistem *in vitro* înalt definit utilizându-se 4 molecule diferite de pMHC pentru fiecare condiție de stimulare și 8 molecule diferite de pMHC pentru fiecare condiție de citire.

Anticorpul purificat costimulator 9.3 anti-uman IG2a CD28 de șoarece (Jung et al., 1987) a fost biotinilat chimic folosindu-se sulfo-N-hidroxisuccinimicobiotină în condițiile recomandate de producător (Perbio, Bonn, Germania). Granulele utilizate au fost de particule de polistiren de 5,6 μm acoperite cu streptavidină (Bangs Laboratories, Illinois, SUA).

pMHC-urile utilizate pentru stimulări de control pozitive și negative au fost A*0201/MLA-001 (peptidă ELAGIGILTV din Melan-A/MART-1 modificat) și A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI din DDX5).

800.000 de granule/ 200 μl au fost acoperite în plăci cu 96 de godeuri în prezența a 4x12,5 ng de biotină-pMHC diferite, au fost spălate și apoi s-au adăugat 600 ng de biotină anti-CD28 într-un volum de 200 μl. Stimulările au fost inițiate în plăci de 96 de godeuri prin coincubare cu 1x10⁶ celule T CD8+ cu 2x10⁵ perle tapetate spălate în 200 μl TCM suplimentat cu 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) pentru 3 zile la 37°C. Jumătate din mediu a fost apoi schimbat cu TCM proaspete suplimentate cu 80 U/ml IL-2, iar incubarea a fost continuată timp de 4 zile la 37°C. Acest ciclu de stimulare sa efectuat în total de trei ori. Pentru citirea multimerului pMHC utilizându-se 8 molecule pMHC diferite per condiție, a fost utilizată o abordare de codificare combinatorică bidimensională, așa cum a fost descris anterior (Andersen et al., 2012), cu modificări minore care cuprind cuplarea la 5 fluorocromi diferiți. În final, s-au efectuat analize multimerice prin colorarea celulelor cu colorant aproape IR viu/mort (Invitrogen, Karlsruhe, Germania), clonă de anticorp CD1-FITC SK1 (BD, Heidelberg, Germania) și multimeri fluorescenți pMHC. Pentru analiză a fost utilizat un citometru BD LSRII SORP echipat cu lasere și filtre adecvate. Celulele specifice peptidei au fost calculate ca procentaje din totalul celulelor CD8+. Evaluarea analizei multimerice a fost efectuată utilizându-se software-ul FlowJo (Tree Star, Oregon, SUA). Amorsarea *in vitro* a limfocitelor multimer+ CD8+ specifice a fost detectată prin comparație cu stimulări de control negative. Imunogenitatea pentru un antigen dat a fost detectată dacă cel puțin un godeu evaluabil stimulat *in vitro* al unui donor sănătos a fost găsit conținând o anumită linie de celule T CD8+ după stimulare *in vitro* (adică acest godeu conține cel puțin 1% de multimer+ specific între celulele T CD8+ și procentajul celulelor

tetramer+ este de cel puțin 10 ori mediana stimulărilor negative).

Imunogenicitatea *in vitro* pentru peptidele HCC

Pentru peptidele HLA de clasă I testate, imunogenitatea *in vitro* se poate demonstra prin generarea de linii de celule T specifice peptidelor. Exemple de rezultate ale citometriei în flux după colorarea cu multimer TUMAP-specific pentru trei peptide din invenție sunt prezentate în Figura 3 și Figura 4 împreună cu controalele negative corespondente.

Exemple de rezultate ale răspunsurilor celulelor T CD8 + specifice peptidelor *in vitro* ale unui donator de HLA-A*02+ sănătos (Figura 3)

Celulele T CD8+ au fost amorate folosindu-se APC-uri artificiale acoperite cu mAb anti-CD28 și HLA-A*02 în complex cu peptida IMA-APOB-002 (SEQ ID NO. 7) (A, panoul din dreapta) sau, respectiv, IMA-APOB-003 (B, panoul din dreapta, SEQ ID NO. 2). După trei cicluri de stimulare, detectarea celulelor reactive la peptide s-a efectuat prin colorare multimerică 2D cu A*02/APOB0-002 (A) sau A*02APOB-003 (B) sau A*02/ALDH1 L1-001. Panourile din stânga (A, B, C) arată colorarea de control a celulelor stimulate cu complexe A*02/peptidice irelevante. Celulele singlet viabile au fost selectate prin gating pentru limfocite CD8+. Porțile booleene au ajutat la excluderea evenimentelor fals pozitive detectate cu multimeri specifici pentru diferite peptide. Sunt indicate frecvențele celulelor multimer+ specifice între limfocitele CD8+.

Exemple de rezultate ale răspunsurilor celulelor T CD8 + specifice peptidelor *in vitro* ale unui donator de HLA-A*24+ sănătos (Figura 4)

Celulele T CD8+ au fost amorate folosindu-se APC-uri artificiale acoperite cu mAb anti-CD28 și HLA-A*24 în complex cu peptida IMA-KLHL24-001 (SEQ ID NO 190) (panoul din dreapta) sau, respectiv, IMA-APOB-006 (B, panoul din dreapta, SEQ ID NO 218). După trei cicluri de stimulare, detectarea celulelor reactive la peptide s-a efectuat prin colorare multimerică 2D cu A*24/ KLHL24-001 (A) sau A*24/ APOB-006 (B). Panourile din stânga (A și B) arată colorarea de control a celulelor stimulate cu complexe A*24/peptidici irelevante. Celulele singlet viabile au fost selectate prin gating pentru limfocite CD8+. Porțile booleene au ajutat la excluderea evenimentelor fals pozitive detectate cu multimeri specifici pentru diferite peptide. Sunt indicate frecvențele celulelor multimer+ specifice între limfocitele CD8+.

Exemplul 5: Sinteze de peptide

Toate peptidele au fost sintetizate utilizându-se sinteza standard și bine stabilită de peptide în fază solidă utilizându-se strategia Fmoc. Identitatea și puritatea fiecărei peptide individuale au fost determinate prin spectrometrie de masă și RP-HPLC analitic. Peptidele au fost obținute sub formă de liofilizați de culoare albă până la albă (sare de trifluoroacetat) cu purități >50%. Toate TUMAP-urile se administrează preferabil ca săruri de trifluoroacetat sau de acetat, fiind posibile și alte săruri.

Listă de referință

- Adler, A. S. et al., Genes Dev. 28 (2014)
- Ahn, Y. H. et al., J Proteomics. 106 (2014)
- Akiyama, H. et al., Oncol Rep. 21 (2009)
- Alam, S. M. et al., Endocr.Relat Cancer 16 (2009)
- Aleman, G. et al., Am J Physiol Endocrinol.Metab 289 (2005)
- Alexanian, A. et al., Cancer Genomics Proteomics. 9 (2012)
- Altenhofer, S. et al., J Biol.Chem. 285 (2010)
- Alvarez, C. et al., J Biol.Chem. 276 (2001)
- Ammerpohl, O. et al., Int.J Cancer 130 (2012)
- Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. 7 (2012)
- Arai, E. et al., Carcinogenesis 33 (2012)
- Araki, T. et al., J Biol.Chem. 286 (2011)
- Arlt, A. et al., Oncogene 28 (2009)
- Arndt, S. et al., Oncol Rep. 18 (2007)
- Arner, E. S. et al., Eur.J Biochem. 267 (2000)

Atienza, J. M. et al., Mol Cancer Ther 4 (2005)

Avery-Kiejda, K. A. et al., BMC.Cancer 14 (2014)

Bachmann, S. B. et al., Mol Cancer 13 (2014)

Balogh, K. et al., Oncogene 31 (2012)

Bani, M. R. et al., Mol Cancer Ther 3 (2004)

Bansal, N. et al., PLoS.One. 6 (2011)

Barbarulo, A. et al., Oncogene 32 (2013)

Bell, J. C. et al., Drug Metab Dispos. 40 (2012)

Ben-Izhak, O. et al., Histopathology 41 (2002)

Bergada, L. et al., Lab Invest 94 (2014)

Bergeron, M. J. et al., Mol Aspects Med. 34 (2013)

Bhattacharya, C. et al., Mol Cancer 11 (2012)

Bhogaraju, S. et al., Science 341 (2013)

Bidkhor, G. et al., PLoS.One. 8 (2013)

Bieche, I. et al., Breast Cancer Res 6 (2004)

Biswas, S. et al., Biochim.Biophys.Acta 1832 (2013)

Blanke, K. L. et al., Cancer Causes Control 25 (2014)

Bodine, S. C. et al., Science 294 (2001)

Boehringer, J. et al., Biochem.J 448 (2012)

Bojjireddy, N. et al., J Cell Sci. (2014)

Booth, D. G. et al., EMBO J 30 (2011)

Bouquet, C. et al., Mol Ther 14 (2006)

Boylan, K. L. et al., Proteome.Sci. 8 (2010)

Braumuller, H. et al., Nature (2013)

Brockmoller, S. F. et al., J Proteome.Res 11 (2012)

Buch, S. C. et al., Mol Carcinog. 51 Suppl 1 (2012)

Bull, C. et al., Cancer Res 74 (2014)

Burrell, R. A. et al., Nature 494 (2013)

Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res 12 (2006)

Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. 9 (2003)

Byrne, A. et al., Exp.Cell Res 316 (2010)

Cadenas, C. et al., Cell Cycle 13 (2014)

Cadore, A. et al., Oncogene 21 (2002)

Cao, H. et al., Biochemistry 41 (2002)

Cao, Y. et al., Cancer Research 61 (2001)

Cao-Ehlker, X. et al., J Biol.Chem. 288 (2013)

Carroll, M. et al., J Interferon Cytokine Res 33 (2013)

Carrouel, F. et al., J Dent.Res 87 (2008)

Castro, M. et al., J Transl.Med. 8 (2010)

Chae, Y. S. et al., Med.Oncol 28 (2011)

Chang, L. O. et al., Cancer Res 33 (1973)

Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. 59 (2007)

Chapiro, J. et al., Radiol.Med. 119 (2014)

Charbonneau, B. et al., Am J Hematol. 87 (2012)

Chatterjee, M. et al., Haematologica 98 (2013)

Chen, J. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 420 (2012a)

Chen, M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 108 (2011a)

Chen, R. et al., World J Gastroenterol. 17 (2011b)

Chen, X. et al., J Dig.Dis. 12 (2011c)

Chen, X. Q. et al., Med.Oncol 29 (2012b)

Cheng, L. et al., Genomics 102 (2013)

Choi, Y. W. et al., Int.J Gynecol.Cancer 17 (2007)

Christa, L. et al., Gastroenterology 106 (1994)

Clark, A. G. et al., Cytoskeleton (Hoboken.) 69 (2012)

Claro da, Silva T. et al., Mol.Aspects Med. 34 (2013)

Cohen, L. et al., Nature 395 (1998)

Collins, C. L. et al., Surgery 122 (1997)

Com, E. et al., J Proteomics. 75 (2012)

Copps, K. D. et al., Diabetologia 55 (2012)

Cornen, S. et al., PLoS.ONE. 9 (2014)

Cornez, I. et al., Biochem.Pharmacol. 75 (2008)

Cowling, V. H., Oncogene 29 (2010)

Cui, T. et al., Int.J Oncol 39 (2011)

da Silva, M. G. et al., Exp.Clin Cardiol. 17 (2012)

Dadkhah, E. et al., Arch.Iran Med. 16 (2013)

Darmanis, S. et al., PLoS.One. 8 (2013)

Darvekar, S. et al., Biochem.J 442 (2012)

Darvekar, S. R. et al., PLoS.One. 9 (2014)

Datta, K. et al., J Biol.Chem. 284 (2009)

David, S. et al., Front Biosci.(Elite.Ed) 5 (2013)

de Almagro, M. C. et al., Biochem.Pharmacol. 81 (2011)

de Groot, J. F. et al., Cancer Res 65 (2005)

Deb, S. et al., Br.J Cancer 110 (2014)

Debauve, G. et al., Cell Mol Life Sci. 65 (2008)

Decker, T. et al., J Clin Invest 109 (2002)

Decock, A. et al., Genome Biol. 13 (2012)

Del Campo, E. M. et al., Mol Phylogenet.Evol. 66 (2013)

Delaval, B. et al., J Cell Biol. 188 (2010)

Deng, X. D. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. 15 (2014)

Di, Gregorio E. et al., J Med.Genet. 50 (2013)

Diggle, C. P. et al., PLoS.Genet. 10 (2014)

Dimitrov, A. et al., Hum.Mol Genet. 18 (2009)

Dmitriev, O. Y., Biochem.Cell Biol. 89 (2011)

Doherty, J. A. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 20 (2011)

Dong, Z. et al., Crit Rev.Oncol Hematol. 59 (2006)

Dou, R. et al., Cancer Lett. 336 (2013)

Drazkowska, K. et al., Nucleic Acids Res 41 (2013)

Edavana, V. K. et al., Drug Metab Dispos. 41 (2013)

Edwards, P. A. et al., Breast Cancer Res 14 (2012)

Elvenes, J. et al., PLoS.One. 6 (2011)

Emaduddin, M. et al., Cell Commun.Signal. 6 (2008)

Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. 6 (2014)

Epelbaum, R. et al., Pathol.Oncol Res 4 (1998)

Fan, T. W. et al., Mol Cancer 8 (2009)

Fang, Z. Q. et al., Genet.Mol Res 12 (2013)

Fassas, A. B. et al., Leuk.Lymphoma 45 (2004)

Feferman, L. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. 16 (2013)

Fei, F. et al., J Cancer Res Clin Oncol (2014a)

Fei, F. et al., Ann Surg.Oncol 21 (2014b)

Feigelson, H. S. et al., Breast Cancer Res 10 (2008)

Feng, L. et al., Cell Biochem.Funct. 29 (2011)

Feng, M. et al., J Clin Invest 124 (2014a)

Feng, S. et al., Int.J Biol.Sci. 9 (2013)

Feng, Y. et al., J Biol.Chem. 289 (2014b)

Feng, Y. et al., Free Radic.Res 46 (2012)

Fernandes, C. F. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 361 (2007)

Ferre, S. et al., J Am Soc Nephrol. 25 (2014)

Ferrer-Ferrer, M. et al., Arch.Med.Res 44 (2013)

Filmus, J. et al., FEBS J 280 (2013)

Fiorito, V. et al., Biochim.Biophys.Acta 1839 (2014)

Fojo, A. T. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 84 (1987)

Fonseca, A. L. et al., Genes Chromosomes.Cancer 51 (2012)

Fossdal, G. et al., ScientificWorldJournal. 2012 (2012)

Fournier, T. et al., Biochim.Biophys.Acta 1482 (2000)

Fu, W. et al., J Cell Sci. 123 (2010)

Fujitomo, T. et al., Cancer Res 72 (2012)

Furukawa, T. et al., Sci.Rep. 1 (2011)

Furutani, M. et al., Hepatology 24 (1996)

Gadd, S. et al., Lab Invest 90 (2010)

Gailani, D., Trends Cardiovasc.Med. 10 (2000)

Galamb, O. et al., Helicobacter. 13 (2008)

Galazis, N. et al., Gynecol.Endocrinol. 29 (2013)

Gandhi, A. V. et al., Ann Surg.Oncol 20 Suppl 3 (2013)

Gao, L. et al., Mol Oncol 6 (2012)

Garcia-Baquero, R. et al., Tumour.Biol. 35 (2014)

Gardner-Stephen, D. A. et al., Drug Metab Dispos. 35 (2007)

Garg, M. et al., Cancer 116 (2010a)

Garg, M. et al., Eur.J Cancer 46 (2010b)

Gburcik, V. et al., Mol Cell Biol. 25 (2005)

Gergely, F. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97 (2000)

Gervasini, G. et al., Cancer 107 (2006)

Getty, A. L. et al., Cell Mol Life Sci. 68 (2011)

Gilabert, M. et al., J Cell Physiol 228 (2013)

Gilkes, D. M. et al., Mol Cancer Res 11 (2013)

Giovannetti, E. et al., J Natl.Cancer Inst. 106 (2014)

Gokmen-Polar, Y. et al., Mod.Pathol. (2014)

Goldstein, I. et al., Carcinogenesis 34 (2013)

Gong, Y. et al., Genet.Mol Res 12 (2013)

Goode, E. L. et al., Clin Cancer Res 16 (2010)

Gordon, E. M. et al., Am.J Pediatr.Hematol.Oncol 15 (1993)

Gotzmann, J. et al., Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr. 9 (1999)

Gray, L. R. et al., Cell Mol Life Sci. 71 (2014)

Gregory, P. A. et al., J Biol.Chem. 278 (2003)

Greif, P. A. et al., Leukemia 25 (2011)

Gu, W. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Guo, L. et al., Cancer Sci. 103 (2012)

Halon, A. et al., Arch.Gynecol.Obstet. 287 (2013)

Hamamoto, R. et al., Cancer Sci. 97 (2006)

Hamilton, S. R. et al., Glycobiology 15 (2005)

Hamm, A. et al., BMC.Cancer 8 (2008)

Hanioka, N. et al., Basic Clin Pharmacol.Toxicol. 110 (2012)

Harris, M. et al., Pharmacogenet.Genomics 24 (2014)

Hatakeyama, H. et al., Proteomics. 6 (2006)

Havens, M. A. et al., PLoS.Genet. 10 (2014)

He, P. et al., Hum.Pathol. 35 (2004)

He, X. et al., Neoplasma 61 (2014a)

He, Y. et al., Mol Carcinog. (2014b)

Hellwinkel, O. J. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. 14 (2011)

Hemmingsson, O. et al., Oncol Rep. 22 (2009)

Hidalgo-Curtis, C. et al., Br.J Haematol. 148 (2010)

Hider, J. L. et al., BMC.Evol.Biol. 13 (2013)

Hinsch, N. et al., BMC.Cancer 9 (2009)

Hirota, Y. et al., Nucleic Acids Res 28 (2000)

Hlavata, I. et al., Mutagenesis 27 (2012)

Hoelz, D. J. et al., Proteomics. 6 (2006)

Holden, H. M. et al., Cell Mol Life Sci. 61 (2004)

Honda, K. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Hong, Y. et al., J Biol.Chem. 274 (1999)

Hood, F. E. et al., Bioarchitecture. 1 (2011)

Hood, F. E. et al., J Cell Biol. 202 (2013)

Hopfer, O. et al., Br.J Cancer 93 (2005)

Horani, A. et al., Am J Hum.Genet. 91 (2012)

Hou, M. et al., Int.J Mol Med. 33 (2014)

Hu, D. G. et al., Drug Metab Rev. 46 (2014)

Hua, D. et al., Int.J Mol Med. 30 (2012a)

Hua, T. et al., J Biol.Chem. 287 (2012b)

Huang, O. et al., Jpn.J Clin Oncol 43 (2013)

Huang, S. et al., Oncogene 21 (2002)

Huang, Y. et al., Oncotarget. 5 (2014)

Hughes, H. et al., J Cell Sci. 123 (2010)

Hunecke, D. et al., J Pathol. 228 (2012)

Huopaniemi, L. et al., Glycobiology 14 (2004)

Hyung, S. W. et al., Mol Cell Proteomics. 10 (2011)

Iannitti, T. et al., Mar.Drugs 8 (2010)

Ichida, K. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 282 (2001)

Ignatova, I. D. et al., Am J Physiol Endocrinol.Metab 296 (2009)

Ikeda, R. et al., Int.J Oncol 38 (2011)

Inuzuka, M. et al., J Biol.Chem. 280 (2005)

Ishiguro, H. et al., Oncogene 21 (2002)

Ishizaki, F. et al., Sci.Rep. 3 (2013)

Ivashchenko, A. T. et al., Biomed.Res Int. 2013 (2013)

Jacquemier, J. et al., Cancer Res 65 (2005)

Jacques, C. et al., Br.J Cancer 101 (2009)

Jaffe, E. K. et al., Arch.Biochem.Biophys. 530 (2013)

Jakobsson, A. et al., Prog.Lipid Res 45 (2006)

Jamroziak, K. et al., Eur.J Haematol. 72 (2004)

Jeung, H. C. et al., Oncologist. 12 (2007)

Jia, Y. et al., Br.J Cancer 110 (2014)

Jiang, J. G. et al., Cancer Res 65 (2005)

Jiang, X. et al., Histol.Histopathol. 25 (2010)

Jiang, X. et al., Mol Carcinog. (2014)

Jin, Z. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. 7 (2014)

Jockusch, H. et al., Proteomics. 14 (2014)

Johnson, M. A. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. 1012 (2004)

Jose-Eneriz, E. S. et al., Br.J Haematol. 142 (2008)

Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987)

Jung, H. J. et al., J Mol Med.(Berl) 91 (2013)

Kaira, K. et al., Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int. 13 (2014)

Kalsotra, A. et al., Toxicol.Appl.Pharmacol. 199 (2004)

Kalthoff, S. et al., J Biol.Chem. 285 (2010)

Kamiyama, S. et al., Glycobiology 21 (2011)

Kamiyama, S. et al., J Biol.Chem. 281 (2006)

Kandil, D. H. et al., Adv.Anat.Pathol. 16 (2009)

Kandimalla, R. et al., Nat Rev.Urol. 10 (2013)

Karvonen, U. et al., J Mol Biol. 382 (2008)

Kelleher, D. J. et al., Glycobiology 16 (2006)

Khan, A. P. et al., Neoplasia. 15 (2013)

Kim, Y. et al., Hum.Pathol. 46 (2015)

Kim, Y. W. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Klein, C. J. et al., Neurology 82 (2014)

Kobayashi, T. et al., *Biochem.J* 400 (2006)

Kollmann, K. et al., *Cancer Cell* 24 (2013)

Komatsu, M. et al., *Pharmacol.Res* 66 (2012)

Kong, S. Y. et al., *Cancer Sci.* 99 (2008)

Kovacevic, Z. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1783 (2008)

Kracmarova, A. et al., *Leuk.Lymphoma* 49 (2008)

Kraemer, N. et al., *Cell Mol Life Sci.* 68 (2011)

Kress, T. R. et al., *Mol Cell* 41 (2011)

Krohn, A. et al., *J Pathol.* 231 (2013)

Krupenko, S. A. et al., *Cell Growth Differ.* 13 (2002)

Kubota, H. et al., *Cell Stress.Chaperones.* 15 (2010)

Kummel, D. et al., *EMBO Rep.* 6 (2005)

Kunutsor, S. K. et al., *Int.J Cancer* (2014)

Kuriyama, H. et al., *Gene* 253 (2000)

Laezza, F. et al., *Mol Cell Neurosci.* 34 (2007)

Lahiri, S. et al., *PLoS.Biol.* 12 (2014)

Lando, M. et al., *J Pathol.* 230 (2013)

Lapucci, A. et al., *FASEB J* 24 (2010)

Lascorz, J. et al., *BMC.Med.Genet.* 13 (2012)

Lauffart, B. et al., *BMC.Womens Health* 5 (2005)

Laverdiere, I. et al., *Endocr.Relat Cancer* (2014)

Leasure, C. D. et al., *Plant Physiol* 150 (2009)

Lee, C. H. et al., Hum.Reprod. 24 (2009)

Lee, K. W. et al., J Biol.Chem. 288 (2013)

Lee, S. J. et al., Toxicol.Lett. (2014)

Lee, W. C. et al., J Immunother. 28 (2005)

Lee, Y. C. et al., Int.J Cancer 122 (2008)

Lekva, T. et al., PLoS.One. 8 (2013)

LeRoy, P. J. et al., Cancer Res 67 (2007)

Leung, T. et al., Breast Cancer Res 15 (2013)

Levenson, V. V. et al., Somat.Cell Mol Genet. 25 (1999)

Levi, S. et al., Front Pharmacol. 5 (2014)

Li, D. et al., Protein Cell 5 (2014a)

Li, N. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 455 (2014)

Li, X. et al., Med.Oncol 31 (2014b)

Li, Y. et al., Mol Cell Biol. 29 (2009)

Li, Y. H. et al., World J Gastroenterol. 18 (2012)

Liang, J. et al., PLoS.One. 3 (2008)

Lillig, C. H. et al., Antioxid.Redox.Signal. 9 (2007)

Lin, C. H. et al., J Cell Biol. 189 (2010)

Lin, M. C. et al., Oral Oncol 50 (2014)

Lin, S. H. et al., Oncogene 23 (2004)

Lin, Z. et al., Cell Rep. 5 (2013)

Linderoth, J. et al., Br.J Haematol. 141 (2008)

Line, A. et al., Cancer Immunol Immunother. 51 (2002)

Ling, C. et al., EMBO J 26 (2007)

Linge, A. et al., J Proteome.Res 13 (2014)

Lioutas, A. et al., EMBO Rep. 14 (2013)

Liu, C. et al., Nat Med. 20 (2014)

Liu, C. et al., J Natl.Cancer Inst. 105 (2013a)

Liu, H. et al., Carcinogenesis 34 (2013b)

Liu, T. W. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 106 (2009a)

Liu, W. et al., J Biol.Chem. 279 (2004)

Liu, Y. et al., Curr.Drug Targets. 13 (2012)

Liu, Y. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 18 (2009b)

Liu, Y. et al., Oncol Rep. 18 (2007)

Ljungberg, B., Curr.Opin.Urol. 17 (2007)

Llovet, J. M. et al., N.Engl.J Med. 359 (2008)

Lo Re, A. E. et al., J Biol.Chem. 287 (2012)

Lo, W. Y. et al., J Proteome.Res 6 (2007)

Lombardo, Y. et al., Breast Cancer Res 16 (2014)

Lourenco, G. J. et al., Breast Cancer Res Treat. 100 (2006)

Lovelace, L. L. et al., J Biol.Chem. 286 (2011)

Lung, H. L. et al., Int J Cancer 127 (2010)

Lutcke, H., Eur.J Biochem. 228 (1995)

Ma, X. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100 (2003)

Mackiewicz, A. et al., Glycoconj.J 12 (1995)

Mahajan, K. et al., Cancer Lett. 338 (2013)

Mamtani, M. et al., BMC.Res Notes 5 (2012)

Mariani, L. et al., Clin Cancer Res 7 (2001)

Marina, M. et al., Front Biosci.(Landmark.Ed) 19 (2014)

Markiewski, M. M. et al., Nat Immunol 9 (2008)

Martin, T. A. et al., Eur.J Cancer 40 (2004)

Martinez, H. D. et al., Genes Cancer 2 (2011)

Mathison, J. et al., Pathobiology 59 (1991)

Matsubara, J. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 20 (2011)

Matusiak, D. et al., J Histochem.Cytochem. 55 (2007)

McGuire, T. A., Md Med.J 40 (1991)

Medjkane, S. et al., Cell Cycle 11 (2012)

Meijers, J. C. et al., Br.J Haematol. 108 (2000)

Mercer, C. A. et al., Autophagy. 5 (2009)

Mercurio, F. A. et al., Biochemistry 51 (2012)

Midorikawa, Y. et al., Jpn.J Cancer Res. 93 (2002)

Miled, C. et al., Cancer Res 65 (2005)

Milkereit, P. et al., J Biol.Chem. 278 (2003)

Miller, J. C. et al., Mol Carcinog. 48 (2009)

Mohelnikova-Duchonova, B. et al., Pancreas 42 (2013)

Monaco, M. E. et al., Transl.Oncol 3 (2010)

Morandi, F. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Morrissey, J. J. et al., Urology 83 (2014)

Mu, J. et al., J Biol.Chem. 272 (1997)

Murray, D. W. et al., Br.J Cancer 110 (2014)

Murray, J. I. et al., Mol Biol.Cell 15 (2004)

Murrin, L. C. et al., J Neuroimmune.Pharmacol. 2 (2007)

Murthy, K. G. et al., Genes Dev. 9 (1995)

Mydlikova, Z. et al., Neoplasma 57 (2010)

Narita, T. et al., Mol Cell Biol. 23 (2003)

Narjoz, C. et al., PLoS.One. 9 (2014)

Nelson, E. R. et al., Science 342 (2013)

Ngeow, J. et al., Cancer Discov. 4 (2014)

Nibbe, R. K. et al., Mol.Cell Proteomics. 8 (2009)

Nielsen, M. J. et al., Blood 108 (2006)

Noda, T. et al., Hepatology 55 (2012)

Noh, C. K. et al., Clin Biochem. 47 (2014)

Ntikoudi, E. et al., Cancer Treat.Rev. 40 (2014)

Nwosu, V. et al., Hum.Mol Genet. 10 (2001)

Obholz, K. L. et al., Dev.Biol. 298 (2006)

Oeffner, F. et al., Am J Hum.Genet. 84 (2009)

Ofman, R. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 281 (2001)

Ohshima, K. et al., Mol Biol.Evol. 27 (2010)

Oiso, S. et al., *Oncol Rep.* 31 (2014)

Oji, Y. et al., *Int.J Oncol* 44 (2014)

Osada, H. et al., *Int.J Cancer* 112 (2004)

Otero-Rey, E. M. et al., *Oral Oncol* 44 (2008)

Palmer, D. H. et al., *Hepatology* 49 (2009)

Panico, F. et al., *Adv.Cancer Res* 105 (2009)

Park, B. L. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 363 (2007)

Patel, M. R. et al., *Laryngoscope* 121 (2011)

Patel, S. A. et al., *Br.J Cancer* (2014)

Pattani, K. M. et al., *PLoS.ONE.* 7 (2012)

Pavelec, D. M. et al., *Genetics* 183 (2009)

Pawlowska, M. et al., *Drug Metab Dispos.* 41 (2013)

Pehlivan, D. et al., *Eur.J Hum.Genet.* 22 (2014)

Pei, Z. et al., *PLoS.One.* 8 (2013)

Pellanda, H. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol.* 44 (2012)

Peng, R. et al., *J Cell Biol.* 157 (2002)

Perera, S. et al., *J Muscle Res Cell Motil.* 33 (2012)

Persaud-Sawin, D. A. et al., *Hum.Mol Genet.* 11 (2002)

Peters, D. G. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 14 (2005)

Pizon, V. et al., *J Cell Sci.* 115 (2002)

Placke, T. et al., *Blood* 124 (2014)

Plebani, R. et al., *Neoplasia.* 14 (2012)

Poh, W. et al., Mol Cancer 11 (2012)

Porkka, K. P. et al., Genes Chromosomes.Cancer 39 (2004)

Pylypenko, O. et al., Mol Cell 11 (2003)

Qi, L. et al., Cancer Res 74 (2014)

Qin, Y. et al., Pigment Cell Melanoma Res 26 (2013)

Quayle, S. N. et al., Neuro Oncol 14 (2012)

Quek, H. H. et al., DNA Cell Biol. 16 (1997)

Quidville, V. et al., Cancer Res 73 (2013)

Rajadhyaksha, A. M. et al., Am.J Hum.Genet. 87 (2010)

Rajasekaran, A. K. et al., Nucleic Acids Res 23 (1995)

Rajendran, M. et al., Cancer Metastasis Rev. 29 (2010)

Rakheja, D. et al., Mol Genet.Metab 93 (2008)

Ramana, C. V. et al., EMBO J 19 (2000)

Rashad, N. M. et al., Cytokine 68 (2014)

Rath, N. et al., EMBO Rep. 13 (2012)

Recupero, D. et al., Rom.J Morphol.Embryol. 51 (2010)

Reinisch, W. et al., J Immunother. 25 (2002)

Rekdal, C. et al., J Biol.Chem. 275 (2000)

Ren, Y. G. et al., Mol Biol.Cell 15 (2004)

Rennoll, S. A. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 443 (2014)

Rifas, L. et al., Arthritis Rheum. 60 (2009)

Riihila, P. M. et al., J Invest Dermatol. 134 (2014)

Rodriguez, F. J. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. 67 (2008)

Rogov, V. et al., Mol Cell 53 (2014)

Romanuik, T. L. et al., BMC.Genomics 10 (2009)

Roodman, G. D., Ann N.Y.Acad.Sci. 1192 (2010)

Rosado, I. V. et al., RNA. 10 (2004)

Rose, A. E. et al., Cancer Res 71 (2011)

Ross, H. et al., Arch.Pathol.Lab Med. 136 (2012)

Rossi, M. R. et al., Cancer Genet.Cytogenet. 161 (2005)

Rotondo, R. et al., Int.J Cancer 125 (2009)

Rucksaken, R. et al., Cancer Biomark. 12 (2012)

Ruiz, F. X. et al., Biochem.J 440 (2011)

Ruiz, F. X. et al., Front Pharmacol. 3 (2012)

Rutkowski, M. J. et al., Mol Cancer Res 8 (2010)

Rylova, S. N. et al., Cancer Res 62 (2002)

Sahm, F. et al., Cancer Res 73 (2013)

Sahu, A. et al., Immunol Res 17 (1998)

Saito, T. et al., J Biol.Chem. 278 (2003)

Salahshor, S. et al., J Clin Pathol. 58 (2005)

Sang, W. et al., Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi. 42 (2013)

Sangro, B. et al., J Clin Oncol 22 (2004)

Sanz, L. et al., Mol Cell Biol. 15 (1995)

Saponaro, C. et al., Cancer Biomark. 14 (2014)

Sarajlic, A. et al., Breast Cancer Res Treat. 143 (2014)

Sasahira, T. et al., Eur.J Cancer 50 (2014)

Schneider, E. et al., Clin Chim.Acta 374 (2006)

Schofield, A. V. et al., Crit Rev.Biochem.Mol Biol. 48 (2013)

Schulz, E. G. et al., Immunity. 30 (2009)

Seifert, M. et al., J Pathol. 205 (2005)

Senchenko, V. et al., Oncogene 22 (2003)

Shaughnessy, J. D., Jr. et al., Blood 118 (2011)

Shen, F. et al., J Cell Biochem. 112 (2011)

Shi, M. et al., World J Gastroenterol. 10 (2004a)

Shi, Y. et al., Exp.Cell Res 296 (2004b)

Shi, Z. Z. et al., Clin Transl.Oncol 16 (2014)

Shinji, S. et al., Oncol Rep. 15 (2006)

Shodeinde, A. et al., J Mol Biochem. 2 (2013)

Shubbar, E. et al., BMC.Cancer 13 (2013)

Shurbaji, M. S. et al., Am J Clin Pathol. 96 (1991)

Sillars-Hardebol, A. H. et al., Gut 61 (2012)

Singh, S. et al., Tumour.Biol. (2014)

Smith, P. et al., Clin Cancer Res 13 (2007)

Song, C. et al., J Biol.Chem. 288 (2013)

Srivenugopal, K. S. et al., Cancer Lett. 117 (1997)

Staal-van den Brekel AJ et al., Br.J Cancer 76 (1997)

Steen, H. C. et al., J Interferon Cytokine Res. 32 (2012)

Stefanska, B. et al., Clin Cancer Res 20 (2014)

Strassburg, C. P. et al., J Biol.Chem. 273 (1998)

Strassburg, C. P. et al., Mol Pharmacol. 52 (1997)

Sudo, H. et al., Genomics 95 (2010)

Sugihara, T. et al., J Biol.Chem. 276 (2001)

Sun, C. et al., Pathol.Res Pract. 210 (2014)

Sun, X. et al., J Pathol. 226 (2012)

Sun, X. et al., Protein Cell 4 (2013)

Sun, X. J. et al., Zhonghua Yi.Xue.Yi.Chuan Xue.Za Zhi. 22 (2005)

Supernat, A. et al., Oncol Lett. 4 (2012)

Surmacz, E., J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia. 18 (2013)

Suzuki, K. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 368 (2008)

Swallow, C. J. et al., Oncogene 24 (2005)

Tabuchi, K. et al., J Neurosci. 22 (2002)

Taguchi, O. et al., Clin Chim.Acta 244 (1996)

Takayama, T. et al., Cancer 68 (1991)

Takayama, T. et al., Lancet 356 (2000)

Takeda, Y. et al., Glycobiology 24 (2014)

Takemasa, I. et al., Int.J Oncol 40 (2012)

Takeuchi, A. et al., Mol Cell Endocrinol. 384 (2014)

Tan, L. Z. et al., Am J Pathol. 183 (2013)

Tan, M. K. et al., Mol Cell Biol. 31 (2011)

Tanahashi, N. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 243 (1998)

Tanaka, M. et al., Mol Med.Rep. 7 (2013)

Tang, L. et al., Arch.Med.Res 43 (2012)

Tang, X. H. et al., Annu.Rev.Pathol. 6 (2011)

Tao, J. et al., Sci.Transl.Med. 3 (2011)

Tao, R. H. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 341 (2006)

Tao, T. et al., Cell Res 23 (2013)

Tarao, K. et al., Cancer 86 (1999)

Tarao, K. et al., Cancer 79 (1997)

Tasker, P. N. et al., Osteoporos.Int. 17 (2006)

Telikicherla, D. et al., Clin Proteomics. 9 (2012)

Tian, T. et al., Eur.J Cancer 48 (2012)

Tian, Y. et al., BMC.Cancer 14 (2014)

Tomiyama, K. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 107 (2010)

Tomoda, T. et al., J Gastroenterol.Hepatol. 27 (2012)

Tong, J. et al., PLoS.One. 8 (2013)

Tortorella, S. et al., J Membr.Biol. 247 (2014)

Tran, E. et al., Science 344 (2014)

Trougakos, I. P., Gerontology 59 (2013)

Tsai, H. Y. et al., Oncogene 32 (2013)

Uddin, S. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. 4 (2011)

Uehara, Y. et al., Cancer Res 43 (1983)

Urig, S. et al., Semin.Cancer Biol. 16 (2006)

Vainio, P. et al., Am.J Pathol. 178 (2011)

van der Spek, P. J. et al., Genomics 31 (1996)

van Zuylen, W. J. et al., PLoS.Pathog. 8 (2012)

van, den Broek, I et al., Proteomics.Clin Appl. 4 (2010)

van, Duin M. et al., Haematologica 96 (2011)

Vejda, S. et al., Mol Cell Proteomics. 1 (2002)

Vincent, F. et al., Cancer Res 69 (2009)

Wang, B. S. et al., Cell Stress.Chaperones. 18 (2013a)

Wang, D. et al., J Biol.Chem. 277 (2002)

Wang, J. et al., Eur.J Cancer Prev. 22 (2013b)

Wang, J. et al., J Clin Invest 112 (2003)

Wang, J. et al., Cancer Prev.Res (Phila) 6 (2013c)

Wang, J. C. et al., Oncology 81 (2011)

Wang, M. et al., Chin J Physiol 55 (2012)

Wang, S. K. et al., PLoS.Genet. 9 (2013d)

Wang, S. S. et al., PLoS.One. 5 (2010)

Wang, X. et al., Urol.Int. 92 (2014)

Wang, Y. et al., J Biol.Chem. 274 (1999)

Wang, Y. et al., Med.Oncol 32 (2015)

Wazir, U. et al., Cell Mol Biol.Lett. 18 (2013)

Wazir, U. et al., *Anticancer Res* 32 (2012)

Weiss, J. et al., *Int.J Antimicrob.Agents* 41 (2013)

Welsh, M. M. et al., *Carcinogenesis* 29 (2008)

Wieser, R., *Leuk.Lymphoma* 43 (2002)

Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res.* 64 (2004)

Williams, A. L. et al., *Nature* 506 (2014)

Witte, I. et al., *Cell Death.Dis.* 2 (2011)

Wong, K. K. et al., *Leukemia* 28 (2014)

Wong, N. et al., *J Hepatol.* 38 (2003)

Wu, L. et al., *Ann Hematol.* 91 (2012)

Wu, N. et al., *Int.J Mol Sci.* 14 (2013a)

Wu, W. et al., *Sci.China Life Sci.* 56 (2013b)

Wu, X. et al., *Am.J Clin Exp.Urol.* 2 (2014)

Wu, Y. M. et al., *Cancer Res* 71 (2011)

Xiao, J. et al., *J Biol.Chem.* 276 (2001)

Xie, F. W. et al., *Neoplasma* 61 (2014)

Xu, H. et al., *Cell Rep.* 9 (2014)

Xu, X. et al., *Proteomics.* 10 (2010)

Yan, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001)

Yang, C. et al., *Virchows Arch.* 463 (2013)

Yang, C. Y. et al., *J Immunol* 192 (2014a)

Yang, H. et al., *Oncol Rep.* 24 (2010)

Yang, H. W. et al., *Oncogene* 0 (2014b)

Yang, R. et al., *Mol Cell Biol.* 31 (2011a)

Yang, Z. J. et al., *Mol Cancer Ther* 10 (2011b)

Yau, C. et al., *Breast Cancer Res* 12 (2010)

Ye, X. H. et al., *Mol Genet.Genomics* (2014)

Yoon, J. K. et al., *J Transl.Med.* 12 (2014)

Yoshimura, S. et al., *J Cell Biol.* 191 (2010)

Yoshizuka, N. et al., *Mol Cancer Res* 10 (2012)

Yosten, G. L. et al., *Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 303 (2012)

Yu, J. H. et al., *RNA.* 11 (2005)

Yu, K. et al., *PLoS.Genet.* 4 (2008)

Yue, C. et al., *Int.J Cancer* 136 (2015)

Zamanian-Daryoush, M. et al., *J Biol.Chem.* 288 (2013)

Zarling, A. L. et al., *Cancer Res* 74 (2014)

Zekri, A. R. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* 13 (2012)

Zelcer, N. et al., *Mol Cell Biol.* 34 (2014)

Zhang, D. et al., *Pak.J Med.Sci.* 29 (2013a)

Zhang, H. et al., *Oncotarget.* 4 (2013b)

Zhang, H. T. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1839 (2014a)

Zhang, J. et al., *Drug Metab Dispos.* 34 (2006)

Zhang, S. et al., *BMC.Cancer* 11 (2011)

Zhang, X. et al., *PLoS.One.* 7 (2012)

Zhang, X. D. et al., Int.J Clin Exp.Med. 7 (2014b)

Zhao, Y. et al., Cell Death.Dis. 4 (2013)

Zhou, B. et al., Cancer Biol.Ther 13 (2012)

Zhou, D. et al., PLoS.One. 8 (2013a)

Zhou, J. et al., Oncol Rep. 30 (2013b)

Zhou, J. et al., Lung Cancer 14 (1996)

Zhu, H. et al., Cell Stress.Chaperones. (2014a)

Zhu, W. L. et al., Anticancer Res 29 (2009)

Zhu, X. et al., Biomed.Pharmacother. 68 (2014b)

Zhuang, Z. et al., J Neurosurg. 115 (2011)

Zietek, Z. et al., Pol.Tyg.Lek. 51 (1996)

Zou, W. et al., Cancer Sci. 101 (2010)

Zu, X. et al., Molecules. 18 (2013)

Zu, X. Y. et al., Recent Pat Anticancer Drug Discov. 7 (2012)

Zynda, E. R. et al., Cell Cycle 13 (2014)