

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **017613**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2013.01.30**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**200970607**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2007.12.20**

---

**(54) УНИВЕРСАЛЬНАЯ ВАКЦИНА ИЗ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

---

**(31)** 60/876,222

**(56)** WO-A-9602143  
WO-A-0174404  
WO-A-0154716

**(32)** 2006.12.20

**(33)** US

**(43)** 2010.04.30

**(86)** PCT/US2007/088457

**(87)** WO 2008/105978 2008.09.04

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**НОВАРКС (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Факхрай Хабиб, Шолер Дэниел Л.  
(US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к композиции для стимуляции иммунного ответа у больных различными формами рака, включая больных аденокарциномой (аденокарцинома, например, толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозный рак, меланома, рак центральной нервной системы и лимфома), содержащей комбинацию аллогенных опухолевых клеток и/или опухолевых стволовых клеток, которые выбраны на основе секретирования по меньшей мере одного иммуносупрессирующего средства, например TGF- $\beta$ , и которые являются генетически модифицированными для того, чтобы уменьшить или ингибировать экспрессию указанного по меньшей мере одного иммуносупрессирующего средства, например TGF- $\beta$ , и которые совместно экспрессируют спектр связанных с опухолью антигенов, представительных для карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы. Изобретение также относится к композиции, содержащей указанную комбинацию аллогенных опухолевых клеток и/или опухолевых стволовых клеток и аллогенную клетку, экспрессирующую цитокин или антитело, которое ингибирует иммуносупрессирующие молекулы.

---

**017613**  
**B1**

**017613**  
**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

По заявке на данный патент испрашивается приоритет предварительной заявки США № 60/876222, поданной 20 декабря 2006 г., полное содержание которой приведено в описании посредством ссылки.

### **Уровень техники изобретения**

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение в целом относится к противораковой терапии, а более конкретно к противоопухолевым вакцинам.

#### **Описание предшествующего уровня техники**

Вакцины представляют собой инъекции веществ, разработанных для активации иммунной системы больного на атаку специфической мишени, такой как раковая клетка. В течение 30 последних лет ученые проводят эксперименты по использованию опухолевых клеток в качестве вакцин. Теория проста: вакцинируя больных раком опухолевыми клетками, вакцина будет индуцировать иммунный ответ, разрушающий опухолевые клетки во всем организме. К несчастью, главный барьер, называемый иммуносупрессия, ограничивает эффективность этой технологии. Иммуносупрессия происходит вследствие продукции большинством опухолевых клеток молекул, которые обеспечивают невидимость клеток для иммунной системы, препятствуя развитию клинически эффективных иммунных ответов.

Запатентованная технология NovaRx помогает преодолеть иммуносупрессивный барьер. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что молекула, называемая трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ), является одной из наиболее мощных иммуносупрессивных молекул, продуцируемых опухолевыми клетками. Предлагаемая технология блокирует иммуносупрессивные эффекты TGF- $\beta$  в вакцине, делая вакцину более эффективной.

Ученые NovaRx впервые в мире продемонстрировали, что новый метод блокирования TGF- $\beta$  сделал вакцины из опухолевых клеток более эффективными. В исследовании, опубликованном в престижном научном журнале "Proceedings of the National Academy of Sciences", ими было продемонстрировано на животных моделях, что технология могла полностью уничтожить быстро растущие опухоли. Позже это исследование было продолжено у пациентов с глиомой (раком головного мозга) и раком легких. В другой работе научные сотрудники NovaRx также показали, что инокуляция аллогенных опухолевых клеток больным колоректальным раком вызывала иммунные ответы, распознающие и нацелено действующие на опухолевые клетки пациента. Однако по причине возникновения иммуносупрессивных эффектов в клетках вакцины терапевтические эффекты не наступали.

#### **Сущность изобретения**

Изобретение относится к композиции для стимуляции иммунного ответа у больных аденокарциномой (аденокарцинома толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также опухоли центральной нервной системы, меланомы, лимфома), сквамозным или другими формами рака и включает комбинацию аллогенных опухолевых клеток и/или стволовых опухолевых клеток, выбранных на основании секретирования по меньшей мере одного иммуносупрессивного средства, например TGF- $\beta$ , и генетически модифицированных с целью уменьшения или ингибирования экспрессии по меньшей мере одного указанного иммуносупрессивного средства, например TGF- $\beta$ , и совместной экспрессии спектр опухолеассоциированных антигенов, характерных для карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы и другой железистой ткани, а также для опухолей центральной нервной системы, меланомы, лимфомы, и физиологически приемлемого носителя. Изобретение также относится к композиции, содержащей указанную комбинацию аллогенных опухолевых клеток и аллогенную клетку, экспрессирующую цитокин или экспрессирующую антигенов, которые блокируют специфические молекулы. Кроме того, изобретение относится к способу стимуляции иммунного ответа больных раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также больных с опухолями центральной нервной системы, больных меланомой, лимфомой, путем введения больным указанной комбинации аллогенных опухолевых клеток, которая стимулирует иммунный ответ к аутологичным опухолевым клеткам больного. Способ дополнительно может включать аллогенную клетку, такую как фибробласт, генетически модифицированную для экспрессии цитокина или экспрессирующую антигенов, которое блокирует специфические молекулы.

### Подробное описание предпочтительного варианта осуществления

Если не указано иного, технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое понятно любому специалисту в данной области техники, к которой относится изобретение. См., например, Singleton P. and Sainsbury D., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons, Chichester, New York, 2001.

Нестандартный термин "содержащий" является синонимом "включающий", "отличающийся тем, что" или "характеризующийся тем, что" и является "включающее/содержащей" формой или открытой и не исключает другие, не перечисленные элементы или стадии способа.

Нестандартная фраза "состоящий из" исключает любые элемент, стадию или составную часть, не перечисленные в формуле, но не исключает дополнительные компоненты или стадии, которые не имеют отношения к изобретению, например включения, обычно с ним связанные.

Нестандартная фраза "по существу, состоящий из" ограничивает объем пункта формулы конкретно указанными материалами или стадиями, и теми, которые существенно не влияют на основные и новые признаки заявленного изобретения.

Изобретение относится к композициям и способам стимуляции иммунного ответа у больного аденокарциномой или другими видами рака, используя аллогенные опухолевые клетки и/или стволовые опухолевые клетки. Композиции и способы по изобретению особенно эффективны для стимуляции иммунного ответа у больного, например, раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой. Аллогенные опухолевые клетки и/или стволовые опухолевые клетки могут быть генетически модифицированы для усиления иммунного ответа. Аллогенная вакцина может дополнительно включать аллогенную клетку, генетически модифицированную для экспрессии цитокина или экспрессии антитела, которые блокируют другие иммунные ингибирующие молекулы. Изобретение также относится к способам стимуляции иммунного ответа у больных различными типами рака, в том числе аденокарциномой, включая больных, например, раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы, и лимфомой, путем введения одной или нескольких аллогенных опухолевых клеток, и/или стволовых опухолевых клеток, где аллогенная опухолевая клетка стимулирует иммунный ответ к аутологичной опухолевой клетке больного.

Способы по изобретению имеют преимущество, заключающееся в применении одной или нескольких аллогенных опухолевых клеток и/или стволовых опухолевых клеток, экспрессирующих антигены, экспрессирующиеся у больного, аденокарциномой, например аденокарциномой толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой, таким образом, стимулируя иммунный ответ к антигенам. Использование аллогенных опухолевых клеток и/или стволовых опухолевых клеток обеспечивает универсальный источник антигенов, которые могут быть введены различным больным по сравнению с использованием аутологичных опухолевых клеток, которые следует выделять у каждого конкретного больного. Способы по изобретению имеют преимущество, заключающееся в использовании аллогенных клеток и/или стволовых опухолевых клеток в качестве противораковой вакцины и стимуляции иммунного ответа против аутологичных опухолевых клеток больного раком.

Как используется в настоящем описании, "аутологичная клетка" относится к клетке, полученной у конкретного индивидуума. В способах по изобретению конкретный индивидуум, у которого получают аутологичную клетку, относится к индивидууму, которому вводят аллогенную вакцину по изобретению. Как используется в настоящем описании, "аутологичная опухолевая клетка" относится к клетке, полученной из опухоли этого индивидуума.

Как используется в настоящем описании, "аллогенная клетка" и/или "опухолевая стволовая клетка" относится к клетке, которую получают не у индивидуума, которому вводят вакцину по изобретению, т.е. к клетке с генетической структурой, отличной от генетической структуры индивидуума. Как правило, аллогенную клетку и/или опухолевые стволовые клетки получают у того же самого вида, что и индивидуум, которому вводится вакцина по изобретению. В частности, аллогенная клетка человека может использоваться для стимуляции иммунного ответа у человека, больного раком. Как используется в настоящем описании, "аллогенная опухолевая клетка и/или опухолевые стволовые клетки" относится к опухолевой клетке, которую получают не у индивидуума, которому вводят аллогенную клетку. Аллогенная опухолевая клетка и/или опухолевые стволовые клетки экспрессируют по меньшей мере один опухолевый антиген, который является общим с антигеном аутологичной опухолевой клетки пациента. Как правило, аллогенную клетку и/или опухолевую стволовую клетку получают из того же или другого типа опухоли, лечение которой осуществляют у пациента. Например, как описано в настоящем документе, пациенту, получающему противораковое лечение в отношении, например, рака толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки,

яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, также как от сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы, можно вводить аллогенную опухолевую клетку, полученную, например, из опухоли толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы, и лимфомы, имеющего общие антигены, или опухолевые стволовые клетки, выделенные из одной опухоли и стимулированной на дифференцировку в различные типы опухолей, благодаря использованию факторов стволовых клеток и кондиционированной среды опухолей, подобных опухоли-мишени. Использование последней процедуры может привести к получению специальной вакцины для индивидуума.

Несмотря на то что аллогенная опухолевая клетка и/или опухолевая стволовая клетка могут быть выделены, например, из опухоли толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы, в способах по изобретению также могут использоваться аллогенные клетки и/или опухолевые стволовые клетки, экспрессирующие один или несколько опухолевых антигенов. Например, аллогенная клетка и/или опухолевая стволовая клетка могут быть изменены или сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать один или несколько опухолевых антигенов, специфичных для конкретной опухоли. Например, для лечения карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы, клетка может быть генетически сконструирована так, чтобы экспрессировать опухолевые антигены, экспрессируемые, например, соответственно в карциноме толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозном раке, меланоме, раке центральной нервной системы и лимфоме. Характерные опухолевые антигены, подходящие для аллогенной опухолевой клетки, используемой для лечения, например, карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы, и лимфомы, включают, например, карциноэмбриональные антигены (CEA), MUC-1, Ep-CAM, HER-2/neu, p53, и MAGE, включая 1, 2, 3, 4, 6 и 12. Другие опухолевые антигены также могут быть экспрессированы в аллогенной клетке и использоваться в аллогенной вакцине по изобретению. Дополнительные опухолевые антигены могут быть идентифицированы с использованием хорошо известных способов скрининга опухолевых антигенов, используя, например, опухолеспецифические антитела. Дополнительные опухолевые антигены могут быть клонированы в аллогенной клетке и экспрессированы. Способы генной инженерии клетки для экспрессии конкретного гена хорошо известны специалистам в данной области (см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999)).

Кроме, например, рака толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы, вакцина по изобретению может использоваться для лечения больных другими типами рака. Поскольку многие аденокарциномы имеют общие антигены, как более подробно описано ниже, вакцина по изобретению, используемая для лечения одного типа аденокарциномы, может также использоваться для лечения других типов аденокарцином, если опухоли имеют антигены, общие с аллогенной опухолевой клеткой вакцины по изобретению. Подобным образом, вакцина по изобретению может быть эффективна для лечения других типов опухолей, имеющих общие антигены. Как использовано в настоящем описании, "больной аденокарциномой" относится к индивидууму с признаками или симптомами аденокарциномы. Аденокарцинома представляет собой злокачественное новообразование эпителиальных клеток железистого или железистоподобного типа. Характерные аденокарциномы включают аденокарциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или других железистых тканей.

Как используется в настоящем описании, "больной раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы, и лимфомой" относится к индивидууму с признаками или симптомами рака толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы. Существует большое число различных используемых медицинских анализов для выявления рака и для них используют различные способы распознавания и определения локализации рака. Некоторые методики обнаружения рака, такие как маммография и колоноскопия, используются для выявления отдельных типов рака. Другие являются более общи-

ми и способны выявить ряд различных типов рака. Специалисты в данной области могут легко определить, имеется ли у индивида признаки или симптомы рака толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы.

Как используется в настоящем описании, "иммунный ответ" относится к измеряемому ответу на антиген, опосредованный одной или более клетками иммунной системы. Иммунный ответ может включать в себя гуморальный или клеточный ответ. Как используется в настоящем описании, иммунный ответ на антиген аутологичной опухолевой клетки относится к измеряемому иммунному ответу по меньшей мере на один антиген, экспрессируемый на поверхности аутологичной опухолевой клетки. Подобным образом, иммунный ответ на аутологичную опухолевую клетку относится к обнаруживаемому иммунному ответу, который является специфичным в отношении аутологичной опухолевой клетки. Как раскрыто в настоящем описании, использование аллогенной вакцины по изобретению у больных раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой приводит к обнаруживаемому иммунному ответу на аутологичные опухолевые клетки.

Как используется в настоящем описании, "ответ цитотоксического Т-лимфоцита" или "ответ CTL" относится к иммунному ответу, при котором активируются цитотоксические Т-клетки. Ответ CTL включает в себя активацию предшественников CTL, а также дифференцированных CTL. Например, как раскрыто в настоящем описании, введение вакцины, содержащей аллогенные клетки карциномы, повышает концентрацию предшественников CTL, специфичных в отношении опухолевых антигенов аллогенных клеток. Вакцина стимулирует также концентрацию CTL в отношении аутологичных опухолевых клеток.

Как используется в настоящем описании, ответ CTL подразумевает включение любого обнаруживаемого ответа CTL в отношении определенного антигена. Предпочтительно ответ CTL включает по меньшей мере один CTL, который является специфичным по отношению к антигену, экспрессируемому на поверхности аутологичной опухолевой клетки. Уровень ответа CTL может изменяться от умеренного ответа до промежуточного ответа, а также выраженного ответа CTL. Даже умеренный ответ может быть эффективным для лечения раковых больных, если такое лечение стимулирует иммунный ответ против аутологичных опухолевых клеток пациента.

Как раскрыто в настоящем описании, вакцина из аллогенных опухолевых клеток повышает концентрацию предшественников CTL у пациента, которому вводили вакцину. Аллогенная вакцина стимулирует 5-10-кратное увеличение концентрации предшественников CTL. Понятно, что любое усиление ответа CTL считается стимулированным ответом CTL, так как ответ CTL направлен против по меньшей мере одного антигена, связанного с аутологичной опухолью пациента.

Как используется в настоящем описании, экзогенный цитокин относится к цитокину, который вводят индивидууму. Например, экзогенный цитокин может быть введен в виде композиции цитокинов, или цитокин может быть введен в виде клетки, которая экспрессирует цитокин.

Вакцина из аллогенных опухолевых клеток по изобретению может быть введена с аллогенной клеткой, экспрессирующей цитокин. Цитокин-экспрессирующая аллогенная клетка может представлять собой неопухолевую клетку, такую как фибробласт, или опухолевую клетку. Например, как раскрыто в настоящем описании, цитокин-экспрессирующая аллогенная клетка фибробласт, генетически модифицированная на экспрессию IL-2, вводится как компонент вакцины аллогенных опухолевых клеток. Цитокины, используемые в способах по изобретению, являются цитокинами, которые усиливают иммунный ответ в отношении опухолевого антигена. Характерные цитокины включают в себя интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, гамма-интерферон и гранулоцитарный макрофагально-колониестимулирующий фактор (GM-CSF). При желании, цитокин может быть экспрессирован в различных функциональных формах при условии, что цитокин сохраняет активность усиливать иммунный ответ. Например, цитокин, такой как GM-CSF, может функционировать в растворимой или мембраносвязанной форме. Особенно эффективными для использования цитокинами в вакцине из аллогенных опухолевых клеток по изобретению являются IL-2 и GM-CSF. Способы модифицирования клеток для экспрессии цитокина с целью стимуляции иммунного ответа хорошо известны специалистам данной области. Характерным экспрессирующимся антителом в противоопухолевой вакцине или вакцине из стволовых опухолевых клеток представляет собой антитело, которое ингибирует PGE2 или CTLA4. Эти молекулы могут быть экспрессированы в рекомбинантных клеточных вакцинах или различных группах аллогенных клеток, таких как аллогенный фибробласт, который комбинирован с вакциной из опухолевых клеток.

Цитокин-экспрессирующая аллогенная клетка может представлять собой любую клетку-носитель, которая обеспечивает экспрессию цитокина на уровне, достаточном для усиления иммунного ответа. Как используется в настоящем описании, усиленный иммунный ответ представляет собой любое измеряемое усиление иммунного ответа. По существу, любой тип клеток, который обеспечивает экспрессию цитокина на уровне, достаточном для усиления иммунного ответа, может быть использован в способах по изобретению. Особенно эффективными аллогенными клетками, экспрессирующими цитокин, являются ал-

логенные клетки фибробласты и аллогенные опухолевые клетки. Способы генетического модифицирования аллогенной клетки для экспрессии цитокина хорошо известны специалистам в данной области (Sambrook et al., supra, 1989; Ausubel et al., supra, 1999). Например, клетка фибробласт генетически модифицирована для экспрессии IL-2.

Кроме того, аллогенные опухолевые клетки и/или опухолевые стволовые клетки могут быть модифицированы для экспрессии цитокина. Аллогенная опухолевая клетка или опухолевая стволовая клетка, экспрессирующая антигены, общие с опухолью пациента, могут быть генетически модифицированы для экспрессии цитокина или антитела, блокирующего иммунные ингибиторы. Например, у больного раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой, аллогенная клетка рака толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы, соответственно раковые клетки могут быть генетически модифицированы для экспрессии цитокина или антитела, блокирующего иммунные ингибиторы, с помощью аллогенных клеток, экспрессирующих общие с опухолью пациента антигены. При желании, цитокин-экспрессирующая опухолевая клетка и/или опухолевые стволовые клетки могут быть генетически модифицированы другими молекулами, используемыми для стимуляции или усиления иммунного ответа, например B7.1 и B7.2. Цитокин, экспрессируемый аллогенной клеткой, может представлять собой любой цитокин, который усиливает иммунный ответ, в том числе те цитокины, что раскрыты в настоящем описании. Особенно эффективные цитокины для использования в способах по изобретению включают IL-2 и GM-CSF, а конкретными антителами являются антитела, которые ингибируют PGE2 или CTLA4. В случае, если цитокин и/или антитело экспрессируются в аллогенной опухолевой клетке, то GM-CSF может быть экспрессирован в мембраносвязанной форме для усиления иммунного ответа против опухолевых антигенов аллогенной опухолевой клетки.

Как используется в настоящем описании, физиологически приемлемый носитель, используемый в вакцинах по изобретению, относится к любым известным компонентам, используемым для иммунизации. Компоненты физиологического носителя предназначены для индукции или усиления иммунного ответа на вводимый в вакцине антиген. Композиции могут содержать буферы для поддержания предпочтительного диапазона pH, соли и другие компоненты, которые презентуют антиген индивидууму в композиции, которая стимулирует иммунный ответ на антиген. Физиологически приемлемый носитель также может содержать один или более адъювантов, которые усиливают иммунный ответ к антигену. Композиции могут быть введены подкожно, внутримышечно, внутрикожно или любым другим способом, подходящим для иммунизации.

Как используется в настоящем описании, термин "адъювант" относится к веществу, которое при добавлении к иммуногенному средству, такому как аллогенная опухолевая клетка, неспецифически усиливает или потенцирует иммунный ответ хозяина-реципиента на средство, под воздействием смеси. Адъюванты могут включать, например, масляно-водные эмульсии, водно-масляные эмульсии, квасцы (соли алюминия), липосомы и микрочастицы, такие как полистирол, крахмал, полифосфазен и полиактид/полигликозиды. Адъюванты могут также включать, например, скваленовые смеси (SAF-I), мурамилпептид, дериваты сапонины, препараты клеточных стенок микобактерий, монофосфорил липид А, дериваты миколевой кислоты, неионные блок-сополимерные поверхностно-активные вещества, QUIL А, субъединица холерного эндотоксина В, полифосфазен и дериваты и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM). Для использования в ветеринарии и для получения антител у животных могут быть использованы митогенные компоненты адъюванта Фрейнда (как полный, так и неполный). Для людей предпочтительным адъювантом является неполный адъювант Фрейнда (IFA). В области техники известны различные подходящие адъюванты. Дополнительные адъюванты включают, например, бациллу Кальметта-Герена (BCG), ДЕТОКС (содержащий остов клеточных стенок *Mycobacterium phlei* (CWS) и монофосфорил липид А из *Salmonella Minnesota* (MPL)), и им подобные.

Кроме того, цитокин или антитело, которое блокирует иммунные ингибиторы, также может быть использован в качестве адъюванта, усиливающего иммунный ответ, как описано в настоящем описании. В частности, в способах по изобретению могут преимущественно использоваться вакцина, содержащая аллогенные опухолевые клетки, и генетически модифицированные аллогенные клетки, экспрессирующие цитокины, такие как IL-2, GM-CSF или другие цитокины, а также антитела, такие как антитела, ингибирующие PGE2 или CTLA4, как раскрыто в настоящем описании. Использование клеток, экспрессирующих цитокин, позволяет усилить иммунный ответ на антигены аллогенных опухолевых клеток, как описано в настоящем описании. Понятно, что при желании можно ввести более одного цитокина, либо прямым введением одного или более цитокинов, или введением цитокинов в виде клетки, экспрессирующей множество цитокинов, или в виде множества клеток, экспрессирующих множество цитокинов, или их комбинацией.

Изобретение относится к композиции, стимулирующей иммунный ответ у больного аденокарциномой. Например, изобретение относится к композиции, стимулирующей иммунный ответ у больного ра-

ком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой. Композиция содержит одну или несколько аллогенных опухолевых клеток и/или опухолевую стволовую клетку и физиологически приемлемый носитель. Изобретение также относится к композиции вещества, содержащей только клетки. Изобретение, кроме того, относится к композиции, содержащей одну или несколько аллогенных опухолевых клеток, генетически модифицированной клетки аллогенного фибробласта, экспрессирующей цитокин, такой как IL-2 или GM-CSF, и физиологически приемлемый носитель. Более того, в композицию, стимулирующую иммунный ответ по изобретению, могут быть включены другие аллогенные опухолевые клетки, как раскрыто в настоящем описании.

Как в настоящем описании раскрыто, аллогенные опухолевые клетки и/или опухолевые стволовые клетки могут быть генетически модифицированы для экспрессии молекул, усиливающих иммунный ответ. Например, аллогенные клетки могут быть модифицированы для экспрессии B7.1 и B7.2. Кроме того, как описано выше, аллогенные опухолевые клетки могут быть модифицированы для экспрессии цитокина.

Аллогенные опухолевые клетки и/или опухолевую стволовую клетку вводят в дозе, достаточной для стимуляции иммунного ответа к одному или более антигенам аллогенной опухолевой клетки, которые являются общими с аутологичной опухолью пациента. Специалист в данной области техники может без труда определить соответствующий уровень дозы для введения подходящих аллогенных опухолевых клеток для индукции иммунного ответа. Подобная доза может составлять по меньшей мере приблизительно 2 в степени  $1 \times 10$  клеток, приблизительно 3 в степени  $1 \times 10$  клеток, приблизительно 4 в степени  $1 \times 10$  клеток, приблизительно 5 в степени  $1 \times 10$  клеток, приблизительно 6 в степени  $1 \times 10$  клеток, приблизительно 7 в степени  $1 \times 10$  клеток, приблизительно 8 в степени  $1 \times 10$  клеток, приблизительно 9 в степени  $1 \times 10$  клеток или приблизительно 10 в степени  $1 \times 10$  клеток или более. Например, как раскрыто в настоящем описании, общая доза введенных аллогенных опухолевых клеток приблизительно 7 в степени  $6 \times 10$  клеток является достаточной для стимуляции ответа CTL. Если вводят более чем одну аллогенную опухолевую клетку, то каждая клетка может быть введена в индивидуальной дозе так, чтобы была введена соответствующая общая доза клеток.

Изобретение также относится к способу стимуляции иммунного ответа у больного аденокарциномой. Например, изобретение также относится к способу стимуляции иммунного ответа у больного раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой. Способ может включать стадию введения пациенту одной или нескольких аллогенных опухолевых клеток, где аллогенная клетка стимулирует иммунный ответ к аутологичной опухолевой клетке пациента. Преимуществом введения аллогенных опухолевых клеток для стимуляции иммунного ответа против опухоли у пациента является отсутствие необходимости выделения клеток у пациента для получения такой противоопухолевой вакцины.

Изобретение, кроме того, относится к способу стимуляции иммунного ответа у больного аденокарциномой, включая больного раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой. Способ включает стадию введения пациенту одной или нескольких аллогенных опухолевых клеток, которые стимулируют ответ цитотоксичных Т-лимфоцитов (CTL) против аутологичных опухолевых клеток пациента.

Изобретение дополнительно относится к способу стимуляции профилактического противоракового иммунного ответа у индивидуумов, вакцинированных рекомбинантной опухолевой клеткой и/или вакциной из опухолевых стволовых клеток, которые будут препятствовать развитию аденокарциномы, включая больного раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой. Способ включает стадию введения индивидууму одной или нескольких рекомбинантных аллогенных опухолевых клеток и/или опухолевых стволовых клеток, где аллогенные клетки стимулируют ответ цитотоксичных Т-лимфоцитов (CTL) к опухолевым клеткам, которые могут возникать у индивидуумов.

Изобретение, кроме того, относится к способу стимуляции профилактического противоракового иммунного ответа у индивидуумов, вакцинированных рекомбинантной опухолевой клеткой и/или вакциной из опухолевых стволовых клеток, которые будут защищать пациента от скрытых опухолей или которые могут представлять собой риск развития аденокарциномы, включая больного раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой. Способ включает стадию введения индивидуу-

мам одной или более рекомбинантных аллогенных опухолевых клеток, где аллогенные клетки стимулируют ответ цитотоксичных Т-лимфоцитов (CTL) к аутологичным опухолевым клеткам и/или опухолевым стволовым клеткам, где аллогенные клетки стимулируют ответ цитотоксичных Т-лимфоцитов (CTL) к опухолевым клеткам, которые могут возникать у индивидуумов или протекать в скрытой форме.

Количество разных аллогенных опухолевых клеток, которые могут быть введены, может изменяться в зависимости от конкретных потребностей вакцины. Например, при желании, ответ CTL может быть стимулирован одной или несколькими аллогенными опухолевыми клетками, двумя или более, тремя или более, четырьмя или более, пятью или более, шестью или более, семью или более, восемью или более, девятью или более и даже десятью или более аллогенными опухолевыми клетками. Количество разных аллогенных опухолевых клеток для введения, может быть легко определено специалистом в данной области путем введения различных количеств опухолевых клеток и линий и определения стимулирован или усилен ли иммунный ответ.

Типичные аллогенные опухолевые клетки и/или опухолевые стволовые клетки, используемые в изобретении, включают клетки, полученные из стационарных линий раковых клеток и из опухолевых клеточных линий, выделенных из раковых биопсий.

Изобретение относится к способу стимуляции иммунного ответа у больного различными видами рака, включая больного аденокарциномой, посредством чего минимизирован ответ CTL к аутологичным не опухолевым клеткам. Например, способ изобретения может быть использован для стимуляции иммунного ответа у больного раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани. Преимущества изобретения состоят в том, что аллогенная вакцина стимулирует ответ CTL против аутологичных опухолевых клеток пациента с минимальным ответом CTL на неопухолевые клетки. В частности, аллогенная вакцина по изобретению дает минимальный ответ CTL на мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Как использовано в настоящем описании, "минимизированный" ответ CTL в отношении аутологических неопухолевых клеток относится к ответу CTL против аутологических неопухолевых клеток, который не определяется или имеет небольшой отрицательный эффект или не имеет отрицательного эффекта у пациента.

Способы по изобретению относятся к лечению больного аденокарциномой, включая больного раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой. По существу, аллогенные опухолевые клетки, используемые в изобретении, представляют собой в целом клетки аденокарциномы, так как эти клетки экспрессируют различные антигены аденокарциномы. Например, аллогенные опухолевые клетки могут представлять собой клетки рака толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы, имеющих общие антигены с антигенами карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы соответственно.

Карцинома толстой кишки, которая является одной из наиболее встречаемых форм рака, является идеальным кандидатом для развития адьювантных иммунотерапевтических подходов. Несмотря на то что лечение большинства больных раком толстой кишки заключается в резекции опухоли и отсутствии клинически выявляемого заболевания сразу после хирургического вмешательства, у многих со временем наблюдается рецидив заболевания в печени или органов брюшной полости из-за наличия не детектируемых диссеминированных микроскопических метастазов. Сравнительная устойчивость к химиотерапии этих рецидивирующих метастазов при раке толстой кишки дополнительно усиливает необходимость в новых способах лечения, таких как адьювантная иммунотерапия.

В настоящем изобретении описаны способы разработки и анализа вакцины из клеточных линий рака толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы, в которых генетически уменьшена или ингибирована экспрессия секретированного другим способом по меньшей мере одного иммуносупрессивного средства, например TGF- $\beta$ . Опухолевые клетки и линии, выбранные для введения в вакцину на основе секреции по меньшей мере одного иммуносупрессивного средства, например TGF- $\beta$ , генетически модифицируют для снижения или ингибирования экспрессии указанного по меньшей мере одного иммуносупрессивного средства, например TGF- $\beta$ , и экспрессии спектра связанных с опухолью антигенов (ТАА), характерных для карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы. Еще в одном варианте осуществления вакцинация больных раком толстой кишки, молочной



железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой, такими опухолевыми клетками и/или линиями опухолевых стволовых клеток, объединенная с IL-2, секретлируемым аллогенными клетками, индуцирует ответ CTL вместе с аутологичной опухолью пациента.

Кроме больных раком толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозным раком, меланомой, раком центральной нервной системы и лимфомой, способы вакцины аллогенных опухолевых клеток могут быть использованы подобным образом и для других типов рака, таких как меланома головного мозга и т.п. Способы по изобретению, в частности, можно использовать для лечения аденокарцином, включая аденокарциному толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, а также сквамозного рака, меланомы, рака центральной нервной системы и лимфомы. Для каждого типа рака, на который нацелено лечение, вакцина может содержать аллогенные опухолевые клетки и/или опухолевые стволовые клетки, экспрессирующие общие антигены с типом рака, на который направлено лечение. Кроме того, вакцина может содержать аллогенные опухолевые клетки типов опухоли. Например, вакцина, содержащая аллогенные клетки карциномы толстой кишки, такие как описаны в описании настоящего изобретения, может быть использована в вакцине для стимуляции иммунного ответа у больного аденокарциномой, например, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани и так далее. Такая вакцина может использоваться, так как аллогенные опухолевые клетки имеют антигены, общие с различными типами опухолей. Например, аденокарцинома молочной железы и легких, а также карцинома толстой кишки экспрессируют CEA, как описано в настоящем патенте.

Кроме вакцины, содержащей только аллогенные опухолевые клетки, изобретение относится к способам, в которых аллогенные опухолевые клетки вводят вместе с цитокином-адьювантом. Вакцина из аллогенных опухолевых клеток может включать введение цитокина, такого как IL-2, GM-CSF или других цитокинов или антител, которые ингибируют молекулы, супрессирующие иммунитет, такие как PGE2 и CTLA4, как описано выше. Кроме того, цитокин-адьювант может быть введен в форме аллогенной клетки, такой как фибробласт или опухолевой клетки, генетически модифицированной для того, чтобы секретировать цитокин, такой как IL-2, GM-CSF или другие иммуностимулирующие цитокины.

Количество вводимого цитокина может быть легко определено специалистом в данной области путем введения различных количеств цитокина и определения того, усилен ли иммунный ответ предпочтительно без возникновения тяжелых или угрожающих жизни побочных эффектов. Клетки можно вводить в различных количествах для достижения желаемого количества цитокина. Как правило, цитокин вводят в дозе, равной по меньшей мере приблизительно 50 единиц, приблизительно 100 единиц, приблизительно 200 единиц, приблизительно 300 единиц, приблизительно 400 единиц, приблизительно 500 единиц, приблизительно 600 единиц, приблизительно 700 единиц, приблизительно 800 единиц, приблизительно 900 единиц, приблизительно 1000 единиц, приблизительно 2000 единиц, приблизительно 3000 единиц, приблизительно 4000 единиц, приблизительно 5000 единиц или выше, если такая доза усиливает иммунный ответ, не вызывая тяжелых или угрожающих жизни побочных эффектов у больного. Как раскрыто в настоящем описании, аллогенная клеточная линия фибробластов может быть генетически модифицирована и секретировать IL-2 и вводиться в различных количествах для того, чтобы подобрать дозу IL-2 в диапазоне от 0 до 4000 единиц.

При иммуногенной терапии использование для иммунизации аллогенных клеток исключает необходимость выявлять для каждого пациента и генетически модифицировать первичный фибробласт и аденокарциному, такую как культуру опухолевых клеток толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани. Логическое объяснение использования аллогенных опухолевых клеток основано на экспрессии общих связанных с опухолью антигенов (ТАА), экспрессируемых как опухолевыми клетками, используемыми для иммунизации, так и клетками опухоли пациента. В карциноме толстой кишки клональная CTL реактивность была использована для определения количества общих ТАА.

Как раскрыто в настоящем описании, вакцина из аллогенных опухолевых клеток, которая может применяться на практике, разработана для иммуногенной терапии рака толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, основанной на иммунологических параметрах стационарных клеточных линий карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани соответственно по сравнению со свежими культурами карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани, соответственно, полученными из

материала биопсии. Вакцину получают из опухолевых клеток или линий, идентифицированных на основе секреции ими по меньшей мере одного иммуносупрессивного средства, например TGF- $\beta$ , генетически модифицированных для уменьшения или ингибирования экспрессии указанного по меньшей мере одного иммуносупрессивного средства, например TGF- $\beta$ , и совместно экспрессировать спектр связанных с опухолью антигенов (ТАА), характерных для карцином толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани.

Вакцинация против рака представляет собой введение опухолевых антигенов в форме либо инактивированных опухолевых клеток или лизатов опухолевых клеток, из которых антиген презентующие клетки (АПК) захватывают опухолевые антигены, и перемещение к лимфоидным тканям для стимуляции CD8<sup>+</sup> цитотоксичные Т-лимфоциты (CTL) или CD4<sup>+</sup> клетки-хелперы иммунной системы. Кроме использования специфических опухолевых антигенов, вакцинацию наиболее часто проводят с помощью дендритных клеток (DC), несущих подходящий белок или пептид или DC, трансфицированными вектором ДНК или РНК. Каждый из этих подходов будет оказывать конкретные воздействия на иммунную систему. Опухолевые антигены, распознаваемые Т-клеткой, могут быть классифицированы либо как опухолеспецифичные антигены (TSA), где гены, кодирующие TSA, обнаруживаются только в опухолевых клетках, и не обнаруживаются в нормальных тканях, или как связанные с опухолью антигены (ТАА), где гены, кодирующие ТАА, сверхэкспрессируются в опухолевых клетках, но при этом также презентуются на низких уровнях в нормальных тканях.

TSA являются, наверное, наиболее желаемой целью противоопухолевой вакцинации или адаптивной терапии. Их опухолеспецифичная экспрессия предотвращает любую ранее существовавшую иммунологическую ауто толерантность, которая может быть обнаружена антигенами, экспрессируемыми в нормальных условиях, даже на низких уровнях и, таким образом, иммунные ответы, направленные против TSA, вряд ли будут повреждать нормальные ткани. Примеры TSA включают антигены видоизмененных вирусов, которые являются причиной того, что инфицированные клетки становятся злокачественными, такие как генетические продукты вируса папилломы человека (HPV) или вирус Эпштейна-Барр (EBV) и продукты мутантных генов, экспрессируемых только в опухолевых клетках, таких как онкогенный белок RAS и BCR/ABL пептидилированный белок.

Данное неполное представление об опухолеспецифичных мутировавших антигенах в качестве CTL мишеней обнаруживает, что большинство пептидов, вовлеченных в ответы CTL у больных раком, представляют собой связанные с опухолью антигены. Этот факт обеспечивает очень много жизнеспособных целей, так как большинство опухолей происходят из нормальных тканей и, таким образом, уровни экспрессии "своих" белков, обнаруженных в этих нормальных тканях, могут стать повышающимися, внося вклад в рост злокачественных образований и обеспечивая подходящие CTL цели. Нет затруднений с презентацией ТАА посредством общих HLA аллелей.

Известно, что карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани экспрессируют множество общих ТАА. ТАА включают такие известные онкобелки, как HER-2/Neu и c-MYC (Ben-Mahrez, K. et al. 1988, Br. J. Cancer 57, 529-534; Disis, M.L. et al. 1994, Cancer Res. 54, 16-20; Disis, M.L. and Cheever, M.A. 1996, 8, 637-642; Yamamoto, A. et al. 1996, Int. J. Cancer 69, 283-289); такие белки, супрессирующие опухоли, как p53 (Soussi, T. 2000, Cancer Res. 60, 1777-1788); такие устойчивые белки, как сурвинуин и фактор роста, выделяемый из эпителия (LEDGF/p75) (Daniels, T. et al. 2005, Prostate 62, 14-26; Rohayem, J. et al. 2000, Cancer Res. 60, 815-817); такие белки, регулирующие клеточный цикл, как циклин B1 (Covini, G. et al. 1997, Hepatology 25, 75-80); такие митозо-ассоциированные белки, как центромерный белок F (CENP-F) (Covini, G et al. 1997, J. Hepatol. 26, 255-265; Casiano, C. A. et al. 1995 J. Autoimmun. 8, 575-586; Rattner, J.B. et al. 1997, Clin. Investig. Med. 20, 308-319); такие хроматин-ассоциированные белки, как топоизомеразы (FePHKndez Madrid, F. 2005, Cancer Lett. 230, 187-198; Imai, H. et al. 1995, Clin. Cancer Res. 1, 417-424); такие мРНК-связанные белки, как p62, IMP1 и Koc (Himoto, T. et al. 2005, Int. J. Oncol. 26, 311-317; Zhang, J. Y. et al. 2001, Clin. Immunol. 100, 149-156) и такие дифференцировочные и антигены рака семенников, как NY-ESO-I (Stockert, E. et al. 1998, J. Exp. Med. 187, 1349-1354) и Melan-A, SSX2, MAGE-I, MAGE-3, тирозиназа и карбоангидраза.

Различные группы используют "серологические протеомные анализы" (SERPA) для идентификации ТАА-кандидатов, связанных с раком молочной железы, включая РНК-связанную белковую регуляторную субъединицу (RS), онкоген DJ-I, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу (G6PD), 70-кДа белок теплового шока 1 (HS71) и дегидролипоамид дегидрогеназу (DLHD) (Canelle, L. et al. 2005, J. Immunol. Methods 299, 77-89; FePHKndez Madrid, F. 2005, Cancer Lett. 230, 187-198; Klade, C.S. 2001, Proteomics 1, 890-898; Naour, F.L. et al. 2002, Technol. Cancer Res. Treat. 1, 257-262). Подход SERPA также был использован для идентификации белка кальретикулина DEAD-box 48 (DDX48) в качестве аутоантигенов мишеней при раке поджелудочной железы (Hong, S.H. et al. 2004, Cancer Res. 64, 5504-5510; Xia, Q. et al. 2005, Biochem. Biophys. Res. Commun. 330, 526-532) и Rho GDP диссоциирующий ингибитор 2 в качестве главного ТАА-кандидата при лейкозе (Cui, J.W. et al. 2005, Mol Cell. Proteomics 4, 1718-1724).

Как раскрыто в настоящем описании, как свежие культуры клеток карциномы толстой кишки, так и стабильные клеточные линии карциномы толстой кишки экспрессируют ряд прежде охарактеризованных ТАА, включая сверхэкспрессию CEA, MUC-I, Ep-CAM, HER-2/neu, семейство MAGE и p53. Shawler, D. L. et al. 2002, Clin Exp Immunol. 129, 99-106. CEA, возможно, является наилучшим охарактеризованным антигеном, связанным с карциномой толстой кишки. Он экспрессируется в 80% случаях рака толстой кишки, причем было показано, что он служит мишенью как гуморального, так и клеточного иммунного ответа и содержит в себе HLA-A2 связанные эпитопы.

Ep-CAM представляет собой антиген клеточной поверхности, связанный с карциномой толстой кишки, который, как было показано, является важной мишенью как для гуморального, так и клеточного иммунитета. MUC-I представляет собой необычный антиген, который может опосредовать МНС-ограниченную и МНС-неограниченную цитотоксичность, предположительно, посредством перекрестного сшивания Т-клеточных рецепторов повторяющимися аминокислотными последовательностями. HER-2/neu представляет собой хорошо характеризуемый ТАА, который может функционировать в качестве антигена для HLA-A2 направленных CTL.

Ген-супрессор опухоли p53 является патологически экспрессируемым в половине карцином толстой кишки. Эпитоп p53, связанный с HLA-A2, относится к дикому типу аминокислотных последовательностей, идентифицированных за последнее время. CTL человека могут выделять данный общий эпитоп в опухолевых клетках, которые сверхэкспрессируют p53.

Как раскрыто в настоящем описании, семейство генов MAGE является часто экспрессируемым в карциномах толстой кишки. MAGE-I был впервые охарактеризован, как связанный с опухолью антиген меланомы, распознаваемый CTL. Такое первоначальное наблюдение распространилось на включение белков семейства MAGE, экспрессируемыми опухолями различных гистологических типов. Было продемонстрировано, что продукты генов MAGE индуцируют активность HLA-A2-ограниченных CTL.

Известно, что карциномы толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другой железистой ткани экспрессируют ряд общих ТАА. Как раскрыто в настоящем описании, как свежие культуры клеток карциномы толстой кишки, так и постоянные клеточные линии карциномы толстой кишки экспрессируют ряд прежде охарактеризованных ТАА, включая сверхэкспрессию CEA, MUC-I, Ep-CAM, HER-2/neu, семейство MAGE и p53. Shawler, D.L. et al. 2002, Clin Exp Immunol. 129, 99-106. CEA, возможно, представляет собой наилучшим образом характеризованный антиген, связанный с карциномой толстой кишки. Он экспрессируется в 80% случаев рака толстой кишки, причем было показано, что он является мишенью как гуморального, так и клеточного иммунного ответа и содержит связывающие эпитопы HLA-A2.

Ep-CAM представляет собой антиген клеточной поверхности, связанный с карциномой толстой кишки, который, как было показано, является важной мишенью как для гуморального, так и клеточного иммунитета. MUC-I является необычным антигеном, который может опосредовать как МНС-ограниченную, так и МНС-неограниченную цитотоксичность, предположительно, посредством перекрестного связывания Т-клеточными рецепторами с помощью повторяющихся аминокислотных последовательностей. HER-2/neu представляет собой хорошо охарактеризованный ТАА, который может функционировать как антиген HLA-A2 направленного CTL.

Ген-супрессор опухоли p53 является патологически экспрессируемым в половине карцином толстой кишки. Эпитоп p53, связанный с HLA-A2, относится к дикому типу аминокислотных последовательностей, идентифицированных за последнее время. CTL человека могут иметь этот общий эпитоп в опухолевых клетках со сверхэкспрессией p53.

Как раскрыто в настоящем описании, семейство генов MAGE зачастую экспрессируется в карциномах толстой кишки. MAGE-I был впервые охарактеризован, как связанный с опухолью антиген меланомы, распознаваемый CTL. Это первоначальное наблюдение распространилось на белки семейства MAGE, экспрессируемые опухолями различных гистологических типов. Было показано, что продукты генов MAGE индуцируют активность HLA-A2-ограниченных CTL.

PGE2 представляет собой молекулу, экспрессируемую опухолевыми клетками, которая ингибирует иммунитет, что обеспечивает возможность опухолевым клеткам избежать воздействия иммунной реакции.

Антиген CTLA4 цитотоксичных Т-лимфоцитов представляет собой молекулу, ингибирующую иммунитет, которая оказывает супрессивное воздействие на индукцию иммунного ответа.

Как использовано в настоящем описании, термин "иммуносупрессивное средство" относится к генному продукту, который оказывает ингибиторное воздействие на функции иммунного ответа. Иммуносупрессивное средство может, например, препятствовать функционированию цитокинов или может ингибировать или супрессировать иммунный ответ посредством других механизмов. Иммуносупрессивные средства известны из уровня техники и включают, например, трансформирующий фактор роста (TGF-β), фактор роста эндотелия сосудов, простагландин E2 (PGE2), интерлейкин (IL)-10 и (IL)-6, также белок p15E, муцины, супрессивный E-рецептор, иммуносупрессивный кислый белок и адгезивные молекулы.

Например, известно, что существуют различные изоформы TGF- $\beta$  и что иммуносупрессивный эффект одной или более данных изоформ TGF- $\beta$  зависит, например, от мишени клетки. Термин "TGF- $\beta$ ", как правило, используется в настоящем описании для обозначения любой изоформы TGF- $\beta$  при условии, что эта изоформа обладает иммуносупрессивной активностью.

Как использовано в настоящем описании, термин "секретировать иммуносупрессивное средство" означает, что опухолевые клетки секретируют измеримый иммуносупрессивный агент. В клеточных линиях, выделенных из биопсий карциномы толстой кишки, TGF- $\beta$  секретируется со значением, равным 480 пг/6 в степени 10 клеток/24 ч и доходит до 1400 пг/6 в степени 10 клеток/24 ч. Как использовано в настоящем описании, термин "уменьшить или ингибировать экспрессию иммуносупрессивного средства" используется в широком смысле и обозначает, что уровень молекулы РНК, кодирующей иммуносупрессивное средство или уровень активности самого иммуносупрессивного средства уменьшен до уровня, меньшего, чем экспрессируемый уровень перед генетической модификацией. Оба термина "уменьшить" или "ингибировать" используются, так как в некоторых случаях, уровень экспрессии иммуносупрессивного средства может быть уменьшен до уровня ниже, чем уровень, который может быть обнаружен посредством конкретного анализа, и, вследствие этого, не может быть определен, если экспрессия иммуносупрессивного средства уменьшена или полностью ингибирована. Использование термина "уменьшить или ингибировать" исключает любую возможную двусмысленность из-за, например, ограничений конкретного анализа.

Трансформирующий фактор роста бета.

Роль членов семейства трансформирующих факторов роста бета (TGF- $\beta$ ) в канцерогенезе является сложной. Названные первоначально благодаря своей трансформирующей активности в опытах *in vitro*, TGF- $\beta$  теперь четко указывают и на опухолесупрессирующую, и на онкогенную активность. В соответствии с существующим принципом супрессорная активность доминирует в нормальных тканях, а во время опухолегенеза изменения в экспрессии TGF- $\beta$  и клеточные ответы преобладают в пользу онкогенной активности.

Путь передачи сигнала TGF- $\beta$  находился в фокусе нескольких обзоров научной литературы. У млекопитающих экспрессируется три изоформы TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3, и каждая кодируется уникальным геном и экспрессируется как в тканеспецифичной, так и в развивающейся регулируемой формах. См., например, последовательность кДНК человека для TGF- $\beta$ 1 (X02812), TGF- $\beta$ 2 (M19154) и TGF- $\beta$ 3 (X14149). TGF- $\beta$ 1 является наиболее распространенной и универсально экспрессируемой изоформой; большинство исследований либо рассматривались или выполнялись с экзогенной TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$  секретируется во внеклеточный матрикс, как латентный белковый комплекс, связанный с латентным связанным белком и одной из четырех изоформ латентного связывающего с TGF- $\beta$  белка. Активация TGF- $\beta$ , которая требуется для биологической активности, происходит посредством не до конца известных механизмов предполагаемого вовлечения протеолитического процессинга связанных белков и высвобождения лиганда TGF- $\beta$ . После активации лиганды TGF- $\beta$  регулируют клеточные процессы путем связывания с тремя высокоаффинными рецепторами клеточной поверхности: тип I TGF- $\beta$  рецептора (T $\beta$ RI), тип II TGF- $\beta$  рецептора (T $\beta$ RII) и тип III TGF- $\beta$  рецептора (T $\beta$ RIII, называемый также бета-гликан). При экспрессии T $\beta$ RIII является наиболее распространенным рецептором TGF- $\beta$  и обычно функционирует путем связывания лигандом TGF- $\beta$  и перемещения его к его сигнальным рецепторам T $\beta$ RI и T $\beta$ RII. T $\beta$ RI и T $\beta$ RII содержат серин/треонинпротеинкиназы в своих внутриклеточных доменах. T $\beta$ RI инициирует внутриклеточную передачу сигнала путем фосфорилирования семейства факторов транскрипции, Smad. Smad2 и Smad3 представляют собой рецептор-активированные Smad для TGF- $\beta$ , так как они фосфорилируются T $\beta$ RI. Smad4 является общим партнером для всех рецептор-активированных Smads. Smad6 и Smad7 являются ингибиторными Smad, которые блокируют фосфорилирование Smad2 или Smad3, ингибируя, таким образом, передачу сигнала TGF- $\beta$ .

Выяснен главный механизм для передачи сигнала TGF- $\beta$ . Лиганд TGF- $\beta$  либо связывается с T $\beta$ RIII, который презентует TGF- $\beta$  к T $\beta$ RII или связывается непосредственно с T $\beta$ RII. Однажды связанный с TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII набирает, связывает и трансфосфорилирует T $\beta$ RI, стимулируя, таким образом, свою протеинкиназную активность. Активированный T $\beta$ RI фосфорилирует Smad2 или Smad3, которые связываются с Smad4. Полученный в результате комплекс Smad транслицируется в ядра и взаимодействует клеточно-специфичным образом с факторами транскрипции для того, чтобы специфически регулировать транскрипцию большого числа TGF- $\beta$ -отвечающих генов. Передача сигналов TGF- $\beta$  регулируется уровнем и продолжительностью активации рецепторов TGF- $\beta$ , с непрерывным ядерно-цитоплазматическим движением вперед и назад Smad, позволяющим им непрерывно отслеживать уровни активированных рецепторов. В дополнение, передача сигналов TGF- $\beta$  может регулироваться посредством интернализации рецепторов, причем некоторые исследования предполагают, что интернализация рецепторов требуется для передачи сигналов, а другие предполагают роль интернализации в нисходящей регуляции передачи сигналов. Хотя T $\beta$ RI, T $\beta$ RII, Smad2, Smad3 и Smad4 охватывают основной Smad-зависимый TGF- $\beta$  путь пе-

редачи данных, сообщалось о Smad-независимой передаче данных посредством митоген-активируемого протеинкиназного (МАРК) пути передачи сигналов, Rho гуанозин трифосфатазы, PI-3 киназы/Akt и протеинфосфатазы 2A.

Методики с использованием антигенов.

По меньшей мере два различных подхода могут быть использованы для направленного воздействия на гены. "Золотой стандарт" представляет собой генный "нокаут", достигаемый гомологичной рекомбинацией (Bronson S.K., Smithies O. J. *Biol Chem* 1994; 269:27155-27158). Данный подход приводит к реальному физическому разрыву намеченного гена в результате кроссоверных превращений, которые происходят во время клеточного деления между направленным вектором и геном, выбранным для разрушения. Гомологичная рекомбинация чрезвычайно эффективна, но технология затруднена тем фактом, что она остается в своей основе малопроизводительной, отнимающей много времени и дорогой. Однако было достигнуто повышение эффективности данного процесса.

Вторым средством для воздействия на гены служат синтетические олигодезоксинуклеотиды (ODN), способные к гибридизации с двухцепочечной ДНК. Подобные гибриды обычно образуются внутри большой бороздки спирали, хотя о гибридизации внутри малой бороздки также сообщалось. В любом случае образуется трехцепочечная молекула, отсюда происхождение термина образующий тройную спираль олигодезоксинуклеотид (TFO). TFO не разрушают ген, но препятствуют его транскрипции либо посредством предотвращения разматывания дуплекса или предотвращения связывания факторов транскрипции с генным промотором. Требования к последовательностям TFO основаны на необходимости для каждого основания, содержащего TFO, образовывать водородные связи (Хугстеновские связи) со своим комплементарным основанием в дуплексе. Это приводит к тому, что TFO вынуждены гибридизоваться с пуриновыми основаниями, составляющими полипуриновые-полипиримидиновые треки в ДНК. Эффективность воздействия TFO дополнительно связана с рядом факторов, включая необходимость в двухвалентных катионах и, возможно, наиболее важно, доступом к ДНК, сжатой в хромосомной структуре. Недавние эксперименты исследователей предоставили свидетельство о том, что образование тройной спирали может наблюдаться в живых клетках, что делает возможным предположить, что такие сложности могут быть в итоге преодолены.

Подходы для специфического нокадауна последовательности мРНК.

Антисмысловые олигонуклеотиды.

Предположение, что малые антисмысловые олигонуклеотиды (ODN) могут быть использованы для специфического ингибирования генной экспрессии, впервые было высказано в 1978 году Stephenson and Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 285 (1978), and Zamecnik and Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 280 (1978). Их исследования показали, что тридекамер (13-мерный) ODN, комплементарный к концевым повторам последовательностей в длинном концевом повторе (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV), ингибируют как трансляцию RSV в бесклеточной системе, так и вирусную репликацию в культивируемых клетках. Исследователям потребовалось несколько лет после этих остроумных экспериментов для того, чтобы начать полностью реализовывать потенциал антисмыслового опосредованного генного ингибирования. С автоматизацией синтеза ODN в начале 1980-х годов, стало относительно несложно получать ODN любой последовательности и тестировать их способность блокировать экспрессию генов посредством спаривания антисмысловых оснований.

Вскоре после демонстрации того, что ODN с фосфодиэфирным остовом были эффективны в качестве специфичных средств-мишеней для блокирования экспрессии генов, было разработано несколько новых модификаций остовов для улучшения стабильности ODN и повышения их эффективность. Наиболее широко используемой модификацией является модификация, при которой немостиковый кислород заменяют атомом серы, получая фосфоротиоатные ODN. Такой тип остова, сформировавший основу для антисмыслового препарата, одобренного Food and Drug Administration (FDA, Rockville, MD, USA), Vitravene (Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA), который выделяет цитомегаловирус IE2 мРНК и используется для лечения цитомегаловирус-ассоциированного ретинита. Второй ODN, Genasense, который выделяет Bcl2 (Genta, Berkely Heights, N.J., USA), недавно прошел фазу III клинических испытаний для метастатической меланомы, где он используется в сочетании со стандартной химиотерапией, усиливающей антисмысловый эффект. Несколько других фосфоротиоатных антисмысловых ODN находятся на ранних стадиях клинических испытаний против ряда типов рака и воспалительных заболеваний.

Механизмы действия ODN в отношении функции блокирования генов меняется в зависимости от остова ODN. Сеть отрицательно заряженных ODN, таких как фосфодиэфирные и фосфоротиоатные, вызывает рибонуклеазное Н-опосредованное расщепление меченых мРНК. Другие модификации остова, которые не задействуют рибонуклеазу Н, по причине отсутствия у них заряда или типа спирали, образованного РНК-мишенью, могут быть классифицированы как стерически затрудненные ODNs. Широко используемые члены данной последней группы включают морфолины, 2'-О-метилы, 2'-О-аллилы, замкнутые нуклеиновые кислоты и пептидные нуклеиновые кислоты (PNA). Данные ODN могут блокировать сплайсинг, трансляцию, ядерно-цитоплазматический перенос и трансляцию, среди других целей ингибирования. Выходя далеко за пределы данного описания для того, чтобы дополнительно углубиться в механизмы действия данного многопланового анализа модификаций ODN и для более подробной инфор-

мации, читатель отсылается к специальному обзору по данному предмету, который подробно описывает каждую из данных модификаций.

#### Рибозимы.

Рибозимы представляют собой молекулы РНК, которые функционируют как ферменты, даже при полном отсутствии белков. Они проявляют каталитическую активность при разрыве и/или формировании ковалентных связей с исключительной специфичностью, ускоряя, таким образом, спонтанную интенсивность намеченных реакций на порядок величин. Способность РНК выступать в качестве катализатора была впервые показана для самосплайсинга интронов группы I *Tetrahymena thermophila* и участка РНК рибонуклеазы Р. После обнаружения двух данных ферментов РНК, был открыт РНК-опосредованный катализ, связанный с самосплайсингом интронов группы II дрожжевых грибов, митохондрий грибов и растений (равно как и хлоропластов), одноцепочечной РНК вириодов и вирусоидов, дельта вируса гепатита и сателлитной РНК из митондрии *Neurospora crassa*. Рибозимы встречаются в природе, но могут также быть сконструированы искусственно для экспрессирования и выделения специфических последовательностей в дис-положении (на той же цепи нуклеиновой кислоте) или транс-положении (нековалентно связанной нуклеиновой кислоты). Новая биохимическая активность развивалась, используя протоколы выбора *in vitro*, а также создавая новые рибозимные мотивы, которые действуют на субстрат иначе, чем РНК.

Эндорибонуклеаза РНКазы Р обнаружена в организмах повсюду в природе. Данный фермент имеет РНК и один или более компонентов белка, в зависимости от организма, из которого его выделили. Компонент РНК из ферментов *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* может действовать в качестве сайт-специфического средства расщепления в отсутствие белка в некоторых солевых и ионных условиях. Изучение потребностей субстрата для ферментов человека и бактерий показывают, что минимальные субстраты для любого фермента имеют сходство с сегментом транспортной молекулы РНК. Данная структура может быть имитирована посредством специально сконструированных антисмысловых РНК, которая образует пару к РНК-мишени и служит в качестве субстрата для РНКазы Р-опосредованного, сайт-специфического расщепления как в пробирке, так и в клетках. Показано также, что антисмысловые компоненты могут быть ковалентно присоединены к РНКазе Р РНК, таким образом, направляя фермент только к интересующей РНК мишени. Исследователи использовали данное свойство в конструировании антисмысловых РНК-аз, которые образуют пары с интересующими мРНК мишенями для того, чтобы стимулировать сайт-специфическое расщепление мишени и для нацеленного ингибирования, как симплексного вируса герпеса, так и цитомегаловируса в клеточной культуре.

Ряд малых патогенных РНК растений (вириодов, сателлитных РНК и вирусоидов), транскрипт плазмиды митохондриальной ДНК *N.Crassa* и дельта вирус гепатита животных подвергаются реакции саморасщепления *in vitro* в отсутствие белка. Реакция требует нейтральной pH и  $Mg^{2+}$ . Реакция саморасщепления представляет собой составную часть механизма репликации *in vivo* по типу разматывающегося рулона. Данные саморасщепляющиеся РНК могут подразделяться на группы в зависимости от последовательности и вторичной структуры, образованной около сайта расщепления. Небольшие рибозимы были получены из мотива, найденного в РНК одноцепочечного вириода растения и вирусоида. На основе формы вторичной структуры и сохраненного набора нуклеотидов термин "головка молотка" был дан группе данных саморасщепляющихся доменов. Рибозим по типу головки молотка составлен из 30 нуклеотидов. Простота каталитического домена по типу головки молотка сделала его популярным выбором при конструировании транс-активных рибозимов. Используя пары оснований Уотсона-Крика, можно сконструировать рибозим по типу головки молотка для того, чтобы расщепить РНК-мишень. Требования сайта расщепления относительно просты и, практически, может быть выделен любой мотив УН последовательностей (где Н представляет собой U, C или A).

Второй саморасщепляющийся мотив, полученный из растений, первоначально идентифицированный в отрицательной цепи сателлитной РНК кольцевой пятнистости табака, был назван "шпилька" или "скрепка". Рибозимы по типу шпильки расщепляют субстраты РНК в обратимой реакции, которая вырабатывает 2',3'-циклофосфаты и 5'-гидроксильные окончания. Созданные варианты данного каталитического мотива также расщепляют и переворачивают в транс-положение многочисленные копии различных целей. Требования субстрата для шпильки включают GUC с немедленно возникающим расщеплением, выше G. Рибозим по типу шпильки катализирует также реакцию сшивания, хотя более часто он используется для реакций расщепления.

Было подано множество заявок по рибозимам в клетках как по типу головки молотка, так и по типу шпильки для понижающего регулирования специфических клеточных и вирусных мишеней. Haseloff and Gerlach, *Nature* 334: 585 (1988) в 1988 году сконструировали мотив по типу головки молотка, который может быть создан для того, чтобы расщеплять любую мишень, модифицируя плечи, которые образуют пары с мишенью. Еще одна лаборатория продемонстрировала, что данный мотив рибозимы по типу головки молотка имел потенциальное терапевтическое применение, основанное на исследовании клеток, созданных для того, чтобы экспрессировать рибозим вируса иммунодефицита человека (HIV), в котором происходило практически полное ингибирование вирусного гена экспрессии и репликации. Со времени данного исследования были буквально тысячи заявок по рибозимному выделению клеточных и вирус-

ных мишеней. Был написан ряд всеобъемлющих обзоров, которые рассмотрели данные заявки и читатель отсылается к ним для дополнительного рассмотрения данного предмета.

ДНКзимы.

Категория сайт-специфически расщепляющих нуклеиновых средств, которая привлекла значительное внимание за последние несколько лет, представляет собой каталитические ДНК. Небольшие ДНК, способные к сайт-специфическому расщеплению РНК-мишеней, получили путем эволюции *in vitro* (поскольку не известно о существовании в природе ДНК энзимов). В результате данного исследования были обнаружены два разных каталитических мотива с различными расщепляющими сайт специфичностями. Наиболее широко используемые 10-20 (нуклеотидные) энзимы связаны со своим РНК субстратам посредством пар оснований Уотсона-Крика и сайт специфически расщепляют РНК мишень, как делают рибозимы по типу головки молотка и шпильки, что приводит к 2',3'-циклофосфату и 5'-ОН окончаниям. Расщепление мРНК-мишеней приводит к их разрушению и ДНКзимы повторно используют и расщепляют множество субстратов. Каталитические ДНК относительно недорогие для синтеза и имеют хорошие каталитические способности, что делает их пригодными субститутами либо для антисмысловой ДНК или для рибозимов.

Было опубликовано несколько заявок по ДНКзимам в культуре клеток, включая ингибирование *veg F* мРНК и последующего предотвращения ангиогенеза и ингибирование экспрессии *bcr/abl* характеристики слияния транскриптов хронического миелолейкоза. Обратной стороной каталитических ДНК по сравнению с рибозимами является то, что их можно доставлять только экзогенно, но они могут быть с модифицированным остовом, что, возможно, позволяет им быть доставленными в отсутствие носителя.

РНКi и siРНК.

РНКi относится к группе механизмов, связанных со сайленсингом генов, имеющих много общих биохимических компонентов, в которых концевая эффекторная молекула представляет собой небольшую 21-23 нуклеотидную антисмысловую РНК. Один механизм использует относительно длинный dsРНК "триггер", процессированный клеточным ферментом *Dicer* в короткие, 21-23 нуклеотидную dsРНК, называемые siРНК. Цепь siРНК, комплементарная к РНК мишени, становится включенной в мультипротеиновый комплекс, именуемый РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс (RISC), где она служит в качестве направляющей для эндонуклеолитического расщепления цепи мРНК в сайте мишени. Это ведет к деградации всей мРНК; антисмысловая siРНК затем может быть использована повторно. У низших организмов РНК-зависимая РНК полимеразы также использует ренатурированную ведущую siРНК в качестве затравки, генерируя дополнительную dsРНК из мишени, которая, в свою очередь, используется в качестве субстрата для *Dicer*, генерируя больше siРНК и усиливая сигнал siРНК. Этот путь обычно используется в качестве механизма вирусной защиты у растений.

Термин siРНК теперь используется повсеместно, всякий раз когда антисмысловая цепь полностью комплементарна сайту мишени мРНК. siРНК может состоять из двух отдельных, ренатурированных одиночных цепочек по 21 нуклеотид, где два концевых 3'-нуклеотида являются непарными (3'-липкие концы). Как вариант, siРНК может быть в форме одиночной стебля-петли, часто относящейся к короткой шпильке РНК (shРНК). Обычно, но не всегда, антисмысловая цепочка siРНК является также комплементарной к кодирующей цепочке партнеру si/shРНК.

Текущие эксперименты показывают, что у делящихся дрожжей dsРНК, кодирующая центромерной ДНК, также опосредует сайленсинг центромерного гетерохроматина и зависит от компонентов пути РНКi. Сходные РНКi-подобные механизмы вовлечены в сайленсинг *MAR*-локуса *Schizosaccharomyces pombe*. Хроматиновый сайленсинг эндогенного *ura4+* гена в транс-положении, инициирован *ura4+* длинностебельной (280 пар оснований) шпилькой, кодирующей на экстрахромосомной плазмиде, требующей как компонентов РНКi, так и *Clr4* (гистонметилазу); распространение гетерохроматина через эухроматин требует ортолог *S. pombe Swi6*. Кроме того, подобный механизм, использующий встречающиеся в природе siРНК, полученные от эндогенных транспозон, был вовлечен в регулирование обычной экспрессии генов хозяина у *S. pombe* во время мейоза.

В клетках млекопитающих длинные dsРНК (обычно больше, чем 30 нуклеотидов в длину) инициируют путь интерферона, активируя протеинкиназу R и 2',5'-олигоденилатсинтазу2. Активация пути интерферона может привести к общей реактивации трансляции, а также общей деградации РНК. Однако сообщалось, что более короткие siРНК, экзогенно введенные в клетки млекопитающих, обходят путь интерферона, хотя недавние свидетельства предполагают, что это не всегда может быть верным.

Антисмысловый продукт siРНК также может быть получен от эндогенных микроРНК. Данные, полученные из экспериментов в нескольких системах воззрений, такой как путь *C. elegans lin4/Hnl4*, предполагают следующий путь для биогенеза микроРНК и регуляции генов в клетках животных. В ядрах удаляются концы транскриптов посредством экзо III РНКазы (*Drosha*, в клетках человека), с образованием 70 нуклеотидной пре-микроРНК отогнутого назад посредника. Пре-микроРНК могут представлять собой мультицистронные, содержащие в себе множество шпилек, направленных против различных РНК-мишеней. Пре-микроРНК активно поставляется в цитоплазму, где *Dicer* процессинг обрезает стебель шпильки и удаляет петлю и кодирующую цепочку для того, чтобы создать итоговый 21-23 нуклеотидный антисмысловый РНКi эффектор. В отличие от прототипной si/shРНК кодирующий и антисмысловый

стебли цепочек партнеров не являются полностью комплементарными, заключая в себе глазки или петли; как структура, так и термодинамические свойства пар оснований являются критическими для правильного процессинга. Кроме того, антисмысловая цепочка содержит в себе некомплемментарность к одному или более сайтам в 3'-нетранслированном участке мРНК мишени, где связывание опосредует репрессию трансляции скорее, чем деградацию мРНК. МикроРНК являются филогенетически широко распространенными и в некоторых случаях консервативными; они также показывают временное и пространственное регулирование. Текущая оценка количества микроРНК человека представляет собой 200-250.

В клетках человека эксперименты с siРНК и микроРНК показали, что независимо от изначальной формы или пути процессинга, расщепление мРНК будет направлять конечная зрелая 21-23 нуклеотидная антисмысловая РНК, полностью гомологичная к мРНК. В целом, эффект от некомплемментарностей между siРНК и сайтами мишенями может изменяться от минимальной до полной отмены активности, по причине того, что она понята только частично; однако по меньшей мере в одном случае частичная гомология приводит к ингибированию трансляции мРНК. В данном отчете siРНК с некомплемментарностями мишенями, сконструированными для того, чтобы имитировать взаимодействие прототипичной микроРНК-мишени, опосредовала ту или иную степень репрессии трансляции, в зависимости, как от специфического взаимодействия, так и от количества сайтов-мишеней в мРНК. Следовательно, является правдоподобным, что структурные особенности, характерные для siРНК или микроРНК являются важными для процессинга и выбора антисмысловой цепочки в RISC и имеют важное значение для конструирования средств, включающих РНКi.

РНКi может быть активирована либо посредством экзогенной доставки преформированных siРНК или посредством промоторной экспрессии siРНК или shРНК. Таким образом, РНКi показал себя в качестве потенциального механизма для специфического нокдауна мРНК транскриптов для нескольких процентов их оригинальных уровней посредством большинства методов определения. РНКi представляется более эффективным, чем антисмысловые РНК, рибозимы или РНКзимы для направленной деструкции сообщений кода, предположительно по причине того, что она использует клеточный механизм, который эффективно направляет антисмысловые компоненты на мРНК мишень для сайт-направленного расщепления.

#### Аптамеры.

Олигонуклеотиды могут представлять собой не только потенциальные лекарственные средства путем связывания комплементарным способом в РНК, но они также могут развиваться путем селекционных процедур через систематическую эволюцию лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX) комбинаторными библиотеками нуклеиновых кислот для того, чтобы связывать с большим количеством мишеней. Подобные олигонуклеотиды называются аптамеры. Их отбирали направленными не только против белков, но также против пептидов и непептидных молекул. Их специфичность и средство с мишенями можно сравнивать со специфичностью и средством антител. В научной литературе производят обзоры потенциала для развития аптамеров в качестве лекарственных средств.

#### Ловушки.

Ловушка представляет собой олигонуклеотид, сконструированный в соответствии с согласованной последовательностью нуклеиновых кислот, узнаваемый конкретным белком, таким как факторы транскрипции, для того, чтобы препятствовать взаимодействию с геномной ДНК мишенью. Ловушки факторов транскрипции представляют собой молекулы, которые имитируют связывающие сайты белков факторов транскрипции и конкурируют с областями промоторов для того, чтобы нейтрализовать данную связывающую активность в ядрах клеток. Белки факторов транскрипции регулируют экспрессию генов путем связывания со специфическими последовательностями ДНК, обнаруженными в области промотора/энхансера генов, которые они контролируют. Хотя большинство связей факторов транскрипции связаны с усилением экспрессии генов, также описывается супрессия генов. Блокируя взаимодействие фактора транскрипции с хромосомной ДНК, ловушки предоставляют мощные средства для воздействия на регуляцию экспрессии генов, особенно по мере того, как факторы транскрипции становятся все больше и больше понятными для того, чтобы изменять экспрессию генов в процессе протекания нормальных и патологических процессов в биологических клетках.

#### Внутриклеточные антитела.

Сочетая сильную специфичность и высокое антигенсвязывающее средство, интратела используют в качестве биотехнологического средства для того, чтобы прерывать, модулировать и определять функции широко спектра антигенов мишеней на посттрансляционном уровне. Интратело представляет собой антитело, которое было сконструировано для того, чтобы внутриклеточно экспрессироваться, и которое может быть направлено на специфическое антитело-мишень, представленное в различных субклеточных локализациях, включая цитозоль, ядра, эндоплазматический ретикулум (ER), митохондрии, пероксисомы, плазматическую мембрану и комплекс Гольджи (TGN), путем лигирования с внутриклеточным транспортом/локализацией пептидных последовательностей. Хотя интратела могут быть экспрессированы в различных формах. Наиболее обычно используемый формат представляет собой одноцепочечное антитело (scFv Ab), созданное посредством объединения различных антигенсвязанных доменов тяжелой



и легкой цепи с межцепочечным линкером (ICL), наиболее часто 15 аминокислотным линкером (GGGGG)<sub>3</sub> между различными тяжелыми (VH) и различными легкими (VL) цепочками. Интратела использовали в изучении рака, HIV, аутоиммунного заболевания, нейродегенеративного заболевания и трансплантации. Используя преимущество высокой специфичности и сродства антитела для его антигена и, практически, неограниченное разнообразие антигенсвязывающих различных доменов, доступных для молекулярного воздействия, интратела технологии выступают, как многообещающие инструменты для того, чтобы создать фенотипический нокаут для того, чтобы управлять биологическими процессами и чтобы получить более детальное понимание геномного функционала.

TGF- $\beta$  связывающие белки.

Рецептор III типа TGF- $\beta$ , известный также как бетагликан, представляет собой закрепленный на мембране протеогликан, который представляет TGF- $\beta$  к сигнальному рецептору II типа. Внеклеточный участок данного рецептора может быть сброшен клеткой в среду. Растворимый бетагликан связывает TGF- $\beta$ , но не укрепляет связывание с мембранными рецепторами. По существу, рекомбинантный растворимый бетагликан действует в качестве патентного ингибитора связывания TGF- $\beta$  с мембранными рецепторами и блокирует функционирование TGF- $\beta$ . Данный результат особенно ясно выражен с изоформой TGF- $\beta$ 2. Воздействие рекомбинантным рецептором III типа TGF- $\beta$  (растворимый RIII) ингибировало ангиогенез и рост опухоли в ксенотрансплантатах рака молочной железы человека и значительно снижал число метастазов в легком и подмышечных лимфатических узлах в данных моделях. Растворимый рецептор II TGF- $\beta$ , похоже, имеет такие же свойства, и как было показано, супрессирует онкогенные свойства в мышечной опухолевой модели. Конституциональная экспрессия растворимого антагониста TGF- $\beta$ , который включает в свою структуру внеклеточный домен рецептора II типа, защищает от метастазирования в мышечной модели. Похоже, что ингибиторы, воздействующие на TGF- $\beta$  рецептор I типа серин-треонин киназу, имеют подобное действие.

Стратегии терапии опухолевых генов.

Успехи молекулярной и опухолевой биологии сильно повлияли на наше понимание генетических изменений, связанных с преобразованием опухоли. Таким образом, были предложены стратегии генной терапии, которые наметили специфические изменения для опухолевых клеток и опухолевой патофизиологии. Данные стратегии воздействия включают, среди других, мутационную компенсацию и иммунопотенцирование.

Мутационная компенсация.

Мутационная компенсация включает коррекцию генетических повреждений, которые являются этиологическими для злокачественного перерождения. Данная стратегия генной терапии известна также, как коррекционная генная терапия, и фокусируется на функциональной абляции экспрессивно-неуправляемых онкогенов, обновлении или аугментации экспрессии опухолесупрессорных генов или вмешательств в пути передачи сигнала некоторых факторов роста или других биохимических процессах, которые оказывают влияние на появление или развитие опухоли. Яркими примерами данной стратегии генной терапии являются восстановление нормального функционирования опухолесупрессирующих генов и блокирование онкогенной активности. В генно-терапевтической стратегии мутационной компенсации было использовано несколько подходов. Они включают антисмысловые олигонуклеотиды, каталитические рибозимы и небольшие олигонуклеотиды, доминантно-отрицательные генные мутации и, совсем недавно, технология малой интерферирующей РНК (siРНК).

Иммунопотенциация.

Модулирование иммунного ответа является особенно привлекательным в качестве разновидности раковой генной терапии. Ключевым фокусом опухолевой генной терапии является усиление способности иммунных систем разрушать опухолевые клетки. Пассивная иммунопотенциация заключается в усилении естественного иммунного ответа для того, чтобы сделать его более эффективным. Активная иммунопотенциация требует иницирование иммунного ответа против неопознанной предварительной опухоли. Иммунопотенциальная генная терапия использует такие стратегии, как экспрессия генов цитокина, который может усилить активность антиген-презентирующих клеток и Т-клеток, экспрессию ко-стимулирующих молекул, таких как B7.1 и B7.2, которые облегчают распознавание и уничтожение опухолевых клеток или доставку экзогенных иммуногенов, которые вызывают локальные воспалительные реакции, повышающие способность антиген-презентирующих клеток узнавать опухолессоциированные антигены.

Несмотря на то что настоящее изобретение описано довольно подробно для целей ясности и понимания, любому специалисту в данной области техники следует понимать, что может быть произведен ряд изменений в форме и деталях, не выходя из объема правомерных правовых притязаний изобретения. Все чертежи, таблицы и приложения, равно как и патенты, заявки и публикации, относящиеся к вышеизложенному, являются, таким образом, включенными посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для стимуляции универсального иммунного ответа у больного любым типом рака, где указанная композиция содержит смесь двух или более различных типов аллогенных опухолевых клеток, где по меньшей мере один тип указанной аллогенной опухолевой клетки содержит опухолевые стволовые клетки, причем для каждого из типов опухолевых клеток характерна секреция иммуносупрессивного средства, которое представляет собой TGF- $\beta$ , PGE-2 или CTLA-4, каждый из типов опухолевых клеток генетически модифицирован и ингибирует экспрессию или активность указанного иммуносупрессивного средства, а различные типы клеток в указанной смеси совместно экспрессируют связанные с опухолью антигены таким образом, что представлен весь спектр связанных с опухолью антигенов, представляющий все типы рака.

2. Композиция по п.1, где указанная смесь аллогенных опухолевых клеток содержит три или более различных типов аллогенных опухолевых клеток.

3. Композиция по п.2, где указанная смесь аллогенных опухолевых клеток содержит четыре или более различных типов аллогенных опухолевых клеток.

4. Композиция по п.3, где указанная смесь аллогенных опухолевых клеток содержит пять или более различных типов аллогенных опухолевых клеток.

5. Композиция по п.4, где указанная смесь аллогенных опухолевых клеток содержит восемь или более различных типов аллогенных опухолевых клеток.

6. Композиция по любому из пп.1-5, дополнительно содержащая генетически модифицированную аллогенную клетку, экспрессирующую цитокин.

7. Композиция по п.6, где указанный цитокин представляет собой IL-2.

8. Композиция по п.6 или 7, где указанная аллогенная клетка, экспрессирующая цитокин, представляет собой фибробласт.

9. Композиция по любому из пп.1-8, где указанная генетическая модификация произведена с помощью гомологической рекомбинации.

10. Композиция по любому из пп.1-8, где указанная генетическая модификация генерирует анти-смысловую молекулу.

11. Композиция по любому из пп.1-8, где указанная генетическая модификация генерирует рибозим.

12. Композиция по любому из пп.1-8, где указанная генетическая модификация генерирует РНКi или siРНК.

13. Композиция по любому из пп.1-12, где указанный тип рака включает рак толстой кишки, молочной железы, легких, предстательной железы, поджелудочной железы, почек, эндометрия, шейки матки, яичников, щитовидной железы или другую карциному или меланому железистой ткани, рак центральной нервной системы или лимфому.

14. Способ стимуляции иммунного ответа у больного раком пациента, включающий введение указанному больному композиции по любому из пп.1-13.

15. Способ стимуляции иммунного ответа у индивидуума с риском развития рака, включающий введение указанному индивидууму композиции по любому из пп.1-13.

16. Способ стимуляции иммунного ответа у индивидуума со скрытой формой рака, включающий введение указанному индивидууму композиции по любому из пп.1-13.

