

I32728WO

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 300, y secuencias variantes de las mismas que son como mínimo homólogas en un 88% a las SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 300, y en que dichas variantes se unen a MHC y/o inducen la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido variante; y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que dicho péptido no es un polipéptido entero.
2. El péptido conforme a la reivindicación 1, en que dicho péptido tiene la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II, y en que dicho péptido, cuando está unido al MHC, es capaz de ser reconocido por linfocitos T CD4 y/o CD8.
3. El péptido o variante del mismo conforme a la reivindicación 1 o 2, en que la secuencia de aminoácidos del mismo comprende un segmento continuo de aminoácidos conforme al grupo de las SEQ ID N.º 1 a SED ID N.º 300.
4. El péptido o la variante del mismo acordes con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho péptido o variante del mismo tiene una longitud total de 8 a 100, preferentemente de 8 a 30, más preferentemente de 8 a 16 aminoácidos, y aún más preferentemente en que dicho péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos acorde con las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.
5. El péptido o variante del mismo acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que dicho péptido es modificado y/o incluye enlaces no peptídicos.
6. El péptido o variante del mismo conforme con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, que en concreto

comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR.

7. Ácido nucleico, que codifica un péptido o variante del mismo acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, opcionalmente ligado a una secuencia promotora heteróloga.

8. Vector de expresión capaz de expresar el ácido nucleico conforme a la reivindicación 7.

9. El péptido o variante del mismo acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el ácido nucleico acorde con la reivindicación 7 o el vector de expresión acorde con la reivindicación 8 para el uso en medicina.

10. Célula hospedadora que comprende el péptido acorde con la reivindicación 1 a 6, el ácido nucleico acorde con la reivindicación 7 o el vector de expresión acorde con la reivindicación 8, en que dicha célula hospedadora preferiblemente es una célula presentadora de antígeno como una célula dendrítica.

11. Método para producir el péptido o variante del mismo acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, método que comprende el cultivo de la célula hospedadora conforme a la reivindicación 10 que presenta el péptido conforme a la reivindicación 1 a 6, o que expresa el ácido nucleico acorde con la reivindicación 7 o el vector de expresión acorde con la reivindicación 8, y el aislamiento del péptido o variante del mismo a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

12. Método *in vitro* para producir linfocitos T activados, método que comprende la puesta en contacto de linfocitos T *in vitro* con antígeno cargado en moléculas MHC de clase I o II humanas que se expresan en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o en un constructo artificial que emula a una célula presentadora de antígeno durante un período de tiempo suficiente para activar dichos linfocitos T de un modo

específico de antígeno, siendo dicho antígeno un péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

13. Linfocito T activado, producido con el método acorde con la reivindicación 12, que reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

14. Método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana presentan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el método la administración al paciente de un número efectivo de linfocitos T activados tal y como se definen en la reivindicación 13.

15. Anticuerpo, soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido o variante del mismo acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, preferiblemente el péptido o variante del mismo acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que está unido a una molécula MHC. Opcionalmente el anticuerpo está dotado de otra función efectora como es un dominio inmunoestimulante o una toxina.

16. Uso de un péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, del ácido nucleico acorde con la reivindicación 7, del vector de expresión acorde con la reivindicación 8, de la célula acorde con la reivindicación 10, del linfocito T activado acorde con la reivindicación 13 o del anticuerpo y de otras moléculas de unión acordes con la reivindicación 15 para el tratamiento del cáncer o para la fabricación de un medicamento contra el cáncer.

17. El uso acorde con la reivindicación 16, en que dicho cáncer es seleccionado entre el grupo consistente en carcinoma hepatocelular, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de colon o de recto o leucemia y otros tumores que presentan una sobreexpresión más preferiblemente de APOB, FASN, COPA, preferiblemente de GLUL, GPAM, PLIN2, SLC16A1, SLC9A3R1, PCBD1, SEC16A, AKR1C4, ABCB11, HAL,

CYP2E1, C4A, C4B, ALDH1L1, CRP, ACSL4, EEF2, HLTF, FBXO22, GALK1, TMCO1, TMEM33, ZNF318, IPO9, AMACR, C1QTNF3, CYP4F8, CYP4F3, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, MOCOS, A1CF, COL18A1, HPR, LBP, C19orf80, CFHR5, ITIH4, TMEM110, LARP4, LMF2, SLC10A5, SLC16A11, y aún preferiblemente de ANKFY1, C12orf44, C16orf58, CPSF1, DCAF8, PEX19, DDX11, DDX12P, DECR2, NME4, DENND5B, DYM, EDC4, ERI3, FAM20A, FNDC3A, GPR107, GYG2, HEATR2, IFT81, KCTD3, SHKBP1, KIAA1324L, KLHL24, MARCH6, MBTPS2, MIR1279, CPSF6, NOC4L, NXF1, PANK2, PCNXL3, PIPSL, PSMD4, PSMD14, SLC35B1, TCP11L2, THNSL2, THOC2, TOMM5, TRAPPC6B, TRIM54, TRIM55, TRIM63, UGGT2, URB1, VPS54, WIZ, ZNF45, RFTN2, SCFD1, SERINC5, CCT7P2, CMAS, ANKS1A, C17orf70, CCT7, CDK5RAP2, CLPTM1, y otra proteína de la cual derive un péptido de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.

18. Un equipo que comprende:

- a) un envase que comprende una composición farmacéutica que contiene el o los péptidos o las variantes conformes a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el o los ácidos nucleicos acordes con la reivindicación 7, el o los vectores de expresión acordes con la reivindicación 8, la o las células acordes con la reivindicación 10, el o los linfocitos T activados acordes con la reivindicación 13 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 15, en solución o en forma liofilizada;
- b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada;
- c) opcionalmente, al menos un péptido más seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a 346, y
- d) opcionalmente, instrucciones para (I) el uso de la solución o (II) la reconstitución y/o el uso de la formulación liofilizada.

19. El equipo acorde con la reivindicación 18, que además comprenda uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (V) una jeringa.

20. El equipo acorde con la reivindicación 18 o 19, en que dicho péptido es seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.

21. Método para producir una vacuna personalizada contra el cáncer para una terapia basada en compuestos y/o en células destinada a un paciente concreto, en que dicho método comprende:

- a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión;
- b) comparación de los péptidos identificados en a) con un archivo o base de datos de péptidos que han sido preseleccionados por su inmunogenicidad y/o su sobrerepresentación en tumores en comparación con los tejidos normales
- c) selección de al menos un péptido del archivo que coincida con el péptido asociado a tumor identificado en el paciente; y
- d) fabricación de la vacuna personalizada o del producto para la terapia basada en compuestos o en células basada en el paso c).

22. El método acorde con la reivindicación 21, en que dichos TUMAP son identificados mediante:

- a1) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal correspondiente con el mismo tipo de tejido que la muestra tumoral para identificar proteínas que se sobreexpresen o se expresen de modo aberrante en la muestra tumoral; y
- a2) correlación de los datos de expresión con las secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar los ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor.

23. El método acorde con la reivindicación 21 o 22, en que las secuencias de los ligandos MHC se identifican eluyendo los péptidos unidos de las moléculas MHC aisladas de la muestra tumoral y secuenciando los ligandos eluidos.

24. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en que el tejido normal correspondiente al tipo de tejido de la muestra tumoral se obtiene del mismo paciente.

25. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en que los péptidos incluidos en el archivo son identificados mediante los pasos siguientes:

aa. Ejecución de un análisis hologenómico de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) mediante métodos con un alto grado de paralelismo, como son la obtención de los perfiles de expresión por medio de micromatrices o de secuenciación, que comprenden la identificación de los genes que están sobreexpresados en el tejido maligno en comparación con el tejido o tejidos normales;

ab. Selección de péptidos codificados por genes que se expresan selectivamente o se sobreexpresan detectados del modo indicado en el paso aa, y

ac. Determinación de la inducción de respuestas de linfocitos T *in vivo* por parte de los péptidos seleccionados que comprenden ensayos de inmunogenicidad *in vitro* con linfocitos T humanos procedentes de donantes sanos o de dicho pacientes; o

ba. Identificación de ligandos de HLA a partir de dicho material tumoral mediante espectrometría de masas;

bb. Ejecución de un análisis hologenómico de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) mediante métodos con un alto nivel de paralelismo, como son la obtención de los perfiles de expresión por medio de micromatrices o de secuenciación, que comprenden la identificación de los genes que aparecen sobreexpresados en el tejido maligno en comparación con el tejido o tejidos normales;

bc. Comparación de los ligandos de HLA identificados con dichos datos de expresión génica;

bd. Selección de los péptidos codificados por los genes que se expresan selectivamente o se sobreexpresan detectados en el paso bc;

be. Volver a detectar los TUMAP seleccionados del paso bd en el tejido tumoral y comprobar que en los tejidos sanos no se detectan o su detección es infrecuente y confirmar la relevancia de la sobreexpresión a nivel del ARNm; y

bf. Determinación de la inducción de respuestas de linfocitos T *in vivo* por parte de los péptidos seleccionados, la cual comprende ensayos de inmunogenicidad *in vitro* con linfocitos T humanos procedentes de donantes sanos o de dicho paciente.

26. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en que la inmunogenicidad de los péptidos incluidos en el archivo se determina con un método que comprende ensayos de inmunogenicidad *in vitro*, la inmunomonitorización del paciente para determinar la unión a HLA individual, tinción de los multímeros de MHC, ensayos ELISPOT y/o tinción intracelular de citocinas.

27. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en que dicho archivo comprende una pluralidad de péptidos seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 346.

28. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, que comprende además la identificación de al menos una mutación que sea exclusiva de la muestra tumoral con respecto al tejido normal correspondiente del paciente en cuestión, y la selección de un péptido que se correlacione con la mutación para la inclusión en la vacuna o para la creación de terapias celulares.

29. El método acorde con la reivindicación 28, en que como mínimo se identifica una mutación tal por medio de la secuenciación hologenómica.

30. Receptor de linfocito T, soluble o unido a membrana, que es reactivo con un ligando HLA, y dicho ligando tiene una identidad de al menos el 75% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.

31. El receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 30, en que dicha secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 88% a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.

32. El receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 30 o 31, en que dicha secuencia de aminoácidos consiste en cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.

33. El receptor de linfocito T acorde con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, en que dicho receptor de linfocito T se provee como una molécula soluble y opcionalmente está dotado de otra función efectora como es un dominio inmunoestimulador o una toxina.

34. Ácido nucleico, que codifica un TCR acorde con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, opcionalmente ligado a una secuencia promotora heteróloga.

35. Vector de expresión capaz de expresar el ácido nucleico conforme a la reivindicación 34.

36. Célula hospedadora que comprende el ácido nucleico acorde con la reivindicación 34 o el ácido nucleico que codifica un anticuerpo acorde con la reivindicación 15 o el vector de expresión acorde con la reivindicación 35, en que dicha célula hospedadora preferiblemente es un linfocito T o una célula NK.

37. Método para producir el receptor de linfocito T acorde con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, método que comprende el cultivo de una célula hospedadora acorde con la reivindicación 36, y el aislamiento de dicho receptor de linfocito T a partir de dicha célula hospedadora y/o de su medio de cultivo.

38. Composición farmacéutica que comprende como mínimo un principio activo seleccionado del grupo consistente en

- a) péptido seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300;
- b) receptor de linfocito T reactivo con un péptido y/o con el complejo de péptido-MHC acorde con a);
- c) proteína de fusión que comprende un péptido acorde con a), y los aminoácidos N-terminales 1 a 80 de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (II);
- d) ácido nucleico que codifica cualquiera de a) a c) o vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico,

- e) célula hospedadora que comprende el vector de expresión de d,
- f) linfocito T activado, obtenido con un método que comprende la puesta en contacto *in vitro* de linfocitos T con un péptido acorde con a) expresado en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar dicho linfocito T de un modo específico de antígeno, así como un método para transferir esos linfocitos T activados al mismo paciente del que proceden o a otros pacientes;
- g) un anticuerpo, o receptor de linfocito T soluble, reactivo a un péptido y/o el complejo de péptido-MHC acorde con a) y/o una célula que presenta un péptido acorde con a), y potencialmente modificada por fusión con, por ejemplo, dominios inmunoactivadores o toxinas,
- h) aptámero que reconoce un péptido seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300 y/o un complejo formado por un péptido seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300 con una molécula MHC,
- i) un péptido o soporte conjugado o marcado acorde con cualquiera de a) a h) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.

39. Un aptámero que reconoce específicamente el péptido o variante del mismo acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, preferiblemente el péptido o variante del mismo acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que se une a una molécula MHC.

40. Composición farmacéutica acorde con la reivindicación 38, que comprende al menos un péptido, y preferiblemente todos los péptidos, seleccionados entre las SEQ ID N.º 1, 2, 7, 225, 228, 301, 303 y 312.