

I32744WO

Nuevos péptidos y nueva combinación de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el cáncer de páncreas y otros tipos de cáncer

La presente invención se refiere a péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y células destinados a la utilización en métodos inmunoterapéuticos. En particular, la presente invención se refiere a la inmunoterapia contra el cáncer. La presente invención se refiere asimismo a epítomos peptídicos para linfocitos T asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que, por ejemplo, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales, o a estimular *ex vivo* linfocitos T que después serán transferidos a los pacientes. Los péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o los péptidos como tales, también pueden ser dianas de anticuerpos, de receptores de linfocitos T solubles, y de otras moléculas de unión.

La presente invención se refiere a varias secuencias peptídicas novedosas y a sus variantes derivadas de moléculas HLA de clase I de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales o como dianas para el desarrollo de compuestos y células farmacéutica o inmunológicamente activos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de cáncer más agresivos y mortíferos que existen. En 2012 fue el 12.º tipo de cáncer más frecuente en los varones, con 178. 000 casos, y el 11.º más frecuente en las mujeres, con 160.000 casos en el mundo. Ese mismo año se contabilizaron 330.000 muertes, lo que convierte al cáncer de páncreas en la séptima causa de muerte por cáncer (World Cancer Report, 2014).

El cáncer de páncreas no es una única entidad tumoral, sino que se pueden distinguir varios tipos distintos. Los tumores exocrinos suponen en torno al 95% de todos los casos de cáncer de páncreas y engloban los adenocarcinomas ductales y acinosos, las neoplasias intraductales papilares mucinosas (IPMN), las neoplasias pseudopapilares sólidas, los adenomas quísticos mucinosos y los cistoadenomas serosos. El 5% restante de los casos de cáncer de páncreas pertenece al subgrupo de los tumores neuroendocrinos pancreáticos (World Cancer Report, 2014).

El adenocarcinoma ductal infiltrante constituye la forma más agresiva del cáncer de páncreas y debido a su alta frecuencia (90% de todos los cánceres de páncreas), los datos epidemiológicos suelen aludir principalmente a este tipo específico (World Cancer Report, 2014).

En el año 2012, el 68% de los casos nuevos aparecieron en los países desarrollados, con la incidencia más elevada en Europa central y oriental, América del Norte, Argentina, Uruguay y Australia. En contraste, la mayoría de los países de África y del este de Asia presentan incidencias bajas. A escala global, las tasas de incidencia parecen ser bastante estables en el tiempo en ambos sexos (World Cancer Report, 2014).

La ausencia de síntomas específicos hace que el cáncer de páncreas se diagnostique habitualmente en un estadio avanzado, con frecuencia metastásico. El pronóstico tras el diagnóstico es francamente negativo, con una supervivencia a 5 años de apenas el 5% y una razón de mortalidad/incidencia de 0,90 (World Cancer Report, 2014).

Varios factores parecen aumentar el riesgo de cáncer de páncreas, entre ellos la edad, puesto que la mayoría de los pacientes son mayores de 65 años en el momento del diagnóstico, y la raza, puesto que en EE. UU. la población afroamericana tiene un riesgo 1,5 veces mayor que la población blanca. Otros factores de riesgo son el tabaquismo, la obesidad, la diabetes, tener un grupo sanguíneo ABO distinto del O, la pancreatitis y los antecedentes familiares de cáncer de páncreas (World Cancer Report, 2014).

Se cree que hasta el 10% de todos los casos cáncer de páncreas tiene una base familiar. Las mutaciones germinales en los genes siguientes se han asociado con un aumento del riesgo de contraer cáncer de páncreas: p16/CDKN2A, BRCA2, PALB2, PRSS1, STK11, ATM y genes reparadores de los errores de emparejamiento del ADN. Además, los casos esporádicos de cáncer de páncreas también se caracterizan por la presencia de mutaciones en diversos oncogenes y genes oncosupresores. Las mutaciones más frecuentes en el adenocarcinoma ductal afectan a los oncogenes KRAS (95%) y AIB1 (hasta el 60%) y a los genes oncosupresores TP53 (75%), p16/CDKN2A (95%) y SMAD4 (55%) (World Cancer Report, 2014).

Las opciones terapéuticas disponibles para los pacientes con cáncer de páncreas son sumamente limitadas. Uno de los principales problemas para conseguir un tratamiento eficaz es lo avanzado que suele estar el tumor cuando se diagnostica. Además, el cáncer de páncreas es bastante resistente a los antineoplásicos, lo que podría tener su causa en el denso e hipovascularizado estroma desmoplásico del tumor.

Según las directrices publicadas por la Sociedad Alemana del Cáncer, la Asociación Alemana de Ayuda contra el Cáncer y la Asociación de Sociedades Médicas Científicas de Alemania la única opción de tratamiento curativa disponible consiste en la resección del tumor. La resección se recomienda si el tumor está circunscrito al páncreas o si las metástasis quedan limitadas a los órganos adyacentes. La resección no se recomienda si el tumor presenta ya metástasis a distancia. A la resección le sigue la quimioterapia adyuvante con gemcitabina o 5-fluorouracilo +/- leucovorina durante seis meses (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Los pacientes con tumores inoperables en estadio avanzado pueden ser tratados con una combinación de quimioterapia y quimiorradioterapia (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

El tratamiento de referencia para la quimioterapia paliativa es la gemcitabina, ya sea en monoterapia o en combinación con el erbolitinib, un inhibidor de la tirosina-cinasa del

receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Otras alternativas consisten en la combinación de 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán y oxaliplatino, también llamado protocolo FOLFIRINOX, o la combinación de gemcitabina con nab-paclitaxel, que ha demostrado mayores efectos que la monoterapia con gemcitabina en el estudio MPACT (Von Hoff et al., 2013; S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

La elevada razón de mortalidad/incidencia hace patente la urgente necesidad de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces contra el cáncer de páncreas.

Las terapias dirigidas, que ya han demostrado su eficacia en otros tipos de cáncer, representan una opción interesante. A tenor de la situación, se han efectuado diversos estudios con el propósito de evaluar el beneficio aportado por las terapias dirigidas en el cáncer de páncreas avanzado, por desgracia con muy escaso éxito (Walker and Ko, 2014). Con todo, la diversidad genética del cáncer de páncreas abre la puerta a la posibilidad de los tratamientos personalizados, como es el caso del adenocarcinoma ductal invasivo, que ha demostrado ser más sensible a la inactivación de los dos alelos de los genes BRCA2 y PALB2 que al tratamiento con inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa y con la mitomicina C (World Cancer Report, 2014).

Actuar contra el estroma del tumor constituye una estrategia alternativa para desarrollar nuevos tratamientos contra el cáncer de páncreas. El estroma denso e hipovascular que lo caracteriza bien podría actuar como barrera contra los antineoplásicos y se ha demostrado que emite señales que promueven la proliferación y la invasión del tumor a la par que el mantenimiento de las células madre cancerosas. Por esa razón se han diseñado diferentes estudios preclínicos y clínicos para analizar el efecto de la eliminación y la inactivación del estroma (Rucki and Zheng, 2014).

Como otra alternativa innovadora y alentadora más, en estos momentos también se están investigando vacunas terapéuticas contra el cáncer de páncreas. Ya se han evaluado en ensayos clínicos vacunas peptídicas dirigidas contra mutaciones de KRAS, telomerasa reactiva, gastrina, survivina, CEA y MUC1, en parte con resultados

prometedores. Asimismo, ensayos clínicos efectuados con vacunas de células dendríticas, vacunas secretoras de GM-CSF alogénicas y algenpantucel-L en pacientes con cáncer también han revelado efectos beneficiosos de la inmunoterapia. Además, hay en curso otros estudios clínicos que investigan la eficacia de diversos protocolos de vacunación (Salman et al., 2013).

A la luz de los graves efectos secundarios y del elevado costo que comporta el tratamiento contra el cáncer, existe la necesidad de descubrir nuevos factores que puedan ser usados en el tratamiento oncológico en general y en el cáncer de páncreas en particular. Existe asimismo la necesidad de descubrir factores que puedan servir como biomarcadores del cáncer en general y del cáncer de páncreas en particular, con vistas a mejorar el diagnóstico, la valoración del pronóstico y la predicción del éxito terapéutico.

La inmunoterapia antitumoral representa una opción de tratamiento dirigido contra las células cancerosas que reduce los efectos secundarios. La inmunoterapia antitumoral aprovecha la existencia de los antígenos asociados a tumores.

La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores (TAA) comprende los siguientes grupos principales:

- a) Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase, que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatocitos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y, por tanto, se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.
- b) Antígenos de diferenciación: Estos TAA son compartidos por los tumores y por el tejido normal del que deriva el tumor. La mayoría de los antígenos de diferenciación conocidos se halla en los melanomas y en los melanocitos normales. Muchas de esas proteínas

relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son la tirosinasa y Melan-A/MART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.

c) TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente distintos y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítomos procesados y posiblemente presentados por los tejidos normales lo sean por debajo del límite necesario para ser reconocidos por los linfocitos T, pero que la sobreexpresión por parte de las células tumorales rompa la tolerancia vigente hasta ese momento y desencadene la respuesta antitumoral. Ejemplos destacados de esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

d) Antígenos específicos de tumor: Estos TAA únicos son fruto de mutaciones de genes normales (como β -catenina, CDK4, etc.). Algunos de esos cambios moleculares están relacionados con la transformación neoplásica y/o su progresión. Los antígenos específicos de tumor generalmente son capaces de inducir potentes respuestas inmunitarias sin riesgo de reacciones autoinmunitarias contra los tejidos normales. Por otro lado, casi siempre estos TAA solo son relevantes para el mismo tumor exacto en el que fueron identificados y normalmente no se encuentran en muchos otros tumores de su tipo. La especificidad (o asociación) tumoral de un péptido también puede surgir si el péptido procede de un exón del (asociado con) tumor en el caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas con el mismo).

e) TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítomos nuevos en tumores, tal y como sucede con MUC1, o de fenómenos como el ajuste de proteínas durante la degradación, que en algunos casos pueden ser específicos de tumor.

f) Proteínas de oncovirus: Estos TAA son proteínas virales que podrían desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y que, como extrañas a causa de su origen no

humano, pueden desencadenar una respuesta de los linfocitos T. Ejemplos de tales proteínas son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

La inmunoterapia basada en los linfocitos T tiene como diana los epítomos peptídicos procedentes de proteínas específicas del tumor o asociadas al mismo, que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T específicos del tumor, esto es, los epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., que son expresadas y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están reguladas al alza en las células del tumor correspondiente.

Existen dos tipos de moléculas MHC: Las MHC de clase I y las MHC de clase II. Las moléculas MHC de clase I están compuestas por una cadena pesada alfa y una beta-2-microglobulina, y las moléculas de clase II por una cadena alfa y otra beta. Su conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos.

Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos procedentes de la proteólisis mayoritariamente de proteínas endógenas, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Las moléculas MHC de clase II, que se encuentran mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan principalmente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC mediante endocitosis y después procesadas por las mismas.

Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de epítomos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) que sean reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos reviste suma importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que estimulen respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic et al., 2003). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Mortara et al., 2006) y que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos o granulocitos (Hwang et al., 2007).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como por ejemplo monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con cáncer se ha descubierto que las células del tumor expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel et al., 2006).

Los péptidos alargados de la invención pueden actuar como epítomos activos para las MHC de clase II.

Los linfocitos T cooperadores, activados por epítomos de MHC de clase II, desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que

desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítomos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores aun sin el concurso de los linfocitos T CD8-positivos a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN- γ)(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan directamente como agentes efectores antitumorales (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células inmunitarias, la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Pero Dengjel y cols. descubrieron varios epítomos de MHC de clase II directamente en tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los linfocitos T citotóxicos CD8+ (ligando: moléculas de MHC de clase I + epítomo peptídico) o por los linfocitos T colaboradores CD4+ (ligando: moléculas de MHC de clase II + epítomo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales.

Para desencadenar la respuesta inmunitaria celular el péptido de MHC de clase I ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y

de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 12 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados («anclaje») en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo cada alelo MHC posee un “motivo de unión” que determina qué péptidos se pueden unir específicamente a la hendidura de unión.

En la reacción inmunitaria dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos por linfocitos T portadores de receptores TCR específicos.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerequisites. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. En una forma de realización preferida, el péptido debe ser presentado en exceso por las células tumorales con respecto a los tejidos sanos normales. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítipo de linfocito T. Un prerequisite para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia inmunitaria hacia ese epítipo en particular.

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluidas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de linfocitos T que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o están basados en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales. No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítipo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, en una forma de realización muy preferida de la invención es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos que sean presentados en exceso o de forma selectiva contra los cuales se encuentre un linfocito T funcional y/o proliferativo. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

En el caso de dirigir la acción contra complejos péptido-MHC a través de TCR específicos (p. ej., TCR solubles) y de los anticuerpos u otras moléculas de unión (soportes) conformes a la invención, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En tales casos, la presentación es el factor determinante.

RESUMEN DE LA INVENCION

En un primer aspecto de la presente invención, ésta se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 67 o a una secuencia variante de la misma que es homóloga al menos en un 77%, preferiblemente al menos un 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 77% o al menos en un 88%) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, en que dicha variante se une a MHC y/o estimula linfocitos T que presentan reactividad cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido el polipéptido entero del que derivaría.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de la presente invención que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 67 o una variante de las mismas, que es homóloga al menos en un 77%, preferiblemente al menos en un 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 77% o al menos en un 88%) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, en que dicho péptido o una variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente de entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

Las tablas siguientes muestran los péptidos conformes con la presente invención, sus respectivas SEQ ID N.º, y los probables genes originarios (subyacentes) de tales péptidos. Todos los péptidos de la Tabla 1 y la Tabla 2 se unen a los alelos HLA-A*02, y los péptidos de la Tabla 2 han sido dados a conocer con anterioridad en grandes listados resultantes del cribado genético ultrarrápido con elevadas tasas de error o son el resultado del cálculo con algoritmos, pero no habían sido vinculados en absoluto con el cáncer hasta ahora. Los péptidos de la Tabla 3 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos de la invención. Los péptidos de las Tablas 4 y 4.2, además, son útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de otras neoplasias malignas que sobreexpresan y/o presentan en exceso el correspondiente polipéptido subyacente.

Tabla 1: Péptidos conformes a la presente invención

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
1	FLAQQESEI	1211, 1212	CLTA, CLTB
2	SLQEEHVAVA	5339	PLEC
3	ALLTFMEQV	165	AEBP1
4	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
5	LLVDDSFLHTV	253982	ASPHD1
6	VLISLKQAPLV	1211	CLTA
7	AQQESEIAGI	1211, 1212	CLTA, CLTB
8	IVDDLITNL	1303	COL12A1
9	FLFDGSANLV	1293	COL6A3
10	FLVDGSSAL	1293	COL6A3
11	FLYKIIDEL	1293	COL6A3
12	FVSEIVDTV	1293	COL6A3
13	LLAGQTYHV	1293	COL6A3
14	VLAKEPGVISV	1293	COL6A3
15	SLANNVTSV	131566	DCBLD2
16	APVNVTTTEVKSV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
17	FLKSGDAAIV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
18	SLLDDELMASL	26088	GGA1
19	HLAPETDEDDL	8100	IFT88
20	RLAGDGVGAV	3855	KRT7
21	HLMDQPLSV	3918	LAMC2
22	TLDGAAVNQV	3918	LAMC2
23	SLSAFTLFL	4060	LUM
24	GLLEELVTV	642475	MROH6
25	SLKEEVGEEAI	4627	MYH9
26	SLKEEVGEEAIV	4627	MYH9
27	YLQGQRLDNV	6447	SCG5
28	YLQGQRLDNVV	6447	SCG5
29	FLQEYLDAI	6317, 6318	SERPINB3, SERPINB4
30	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
31	SLAAAAGKQEL	6750	SST
32	SLAAAAGKQELA	6750	SST
33	SLDSRLELA	81628	TSC22D4
34	MLMPVHFL	114131	UCN3
35	VMDSGDGVTHTV	100996820, 344227, 345651, 440915, 445582, 60, 641455, 653269, 653781, 71, 728378	ACTBL2, POTEKP, POTE, ACTB, POTE, POTEI, POTEJ, ACTG1, POTE

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
36	KQEYDESGPSIVH	100996820, 344227, 440915, 445582, 60, 641455, 653269, 653781, 71, 728378	POTEKP, POTE, ACTB, POTEI, POTEJ, ACTG1, POTEF
37	GLLKKINSV	55107	ANO1
38	NLVEKTPALV	10632, 267020	ATP5L, ATP5L2
39	TLLSNLEEA	1191	CLU
40	FILDSAETTTL	1293	COL6A3
41	FLLDGSEGV	1293	COL6A3
42	KLVDKSTEL	1293	COL6A3
43	RLDQRVPQI	1293	COL6A3
44	VLLDKIKNLQV	1293	COL6A3
45	VADKIHSV	11072	DUSP14
46	TFAPVNVTTTEVKSV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
47	KMDASLGNLFA	10447, 51384	FAM3C, WNT16
48	ALTQTGGPHV	2316	FLNA
49	NLKGTFATL	100187828, 3043, 3045	HBB, HBD
50	ALAAILTRL	80201	HKDC1
51	ALMLQGVDL	3329	HSPD1
52	RMVEEIGVEL	10525	HYOU1
53	SSFGGLGGGSV	3880	KRT19
54	VLLSEIEVA	4134	MAP4
55	YLDAMMNEA	103910, 10627	MYL12B, MYL12A
56	GLLDYATGAIGSV	117583	PARD3B
57	FLGKVVIDV	100271927, 10156	RASA4B, RASA4
58	GLAAFKAFL	5999	RGS4
59	KLFNLSKEDDV	6194	RPS6
60	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
61	ALEKDYEEVGV	10376, 113457, 7278, 7846	TUBA1B, TUBA3D, TUBA3C, TUBA1A
62	ALEKDYEEV	10376, 113457, 51807, 7277, 7278, 7846, 84790	TUBA1B, TUBA3D, TUBA8, TUBA4A, TUBA3C, TUBA1A, TUBA1C
63	FAGDDAPR	100996820, 344227, 445582, 58, 59, 60, 653269, 653781, 70, 71, 72, 728378	POTE, ACTA1, ACTA2, ACTB, POTEI, POTEJ, ACTC1, ACTG1, ACTG2, POTEF

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
64	FLVSNMLLAEA	113791	PIK3IP1

Tabla 2: Péptidos adicionales acordes con la presente invención sin vinculación previa conocida con el cáncer

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
65	YLYDSETKNA	4316	MMP7
66	ALLSGLREA	23028	KDM1A
67	KMFFLIDKV	4599	MX1

Tabla 3: Péptidos útiles, entre otros usos, para terapias personalizadas contra el cáncer

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
68	KLLTEVHAA	101	ADAM8
69	VMAFPTMTI	338	APOB
70	FLVDGSWSV	1303	COL12A1
71	FLLDGSANV	1293	COL6A3
72	YVYQNNIYL	2191	FAP
73	TLVAIVVGV	60681	FKBP10
74	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
75	RLDDLKMTV	3918	LAMC2
76	RLLDSVSRL	3918	LAMC2
77	GLTDNIHLV	25878	MXRA5
78	TLSSIKVEV	25878	MXRA5
79	VLAPRVLRA	5954	RCN1
80	TLYPHTSQV	1462	VCAN
81	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
82	SISDVIAQV	56172	ANKH
83	FLIDSSEGV	1293	COL6A3
84	NLLDLDYEL	1293	COL6A3
85	TVAEVIQSV	55083	KIF26B
86	SLLAQNTSWL L	7070	THY1
87	LLLGSPAAA	23544	SEZ6L

La presente invención además concierne en general a los péptidos conformes con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales

como, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer cerebral, cáncer de colon o recto, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de próstata, melanoma y leucemias.

Se prefieren especialmente los péptidos –solos o en combinación– conformes con la presente invención seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67. Más preferibles aún son los péptidos –solos o en combinación– seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 34 (véase la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), y sus usos en la inmunoterapia contra el cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer cerebral, cáncer de colon o recto, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de próstata, melanoma y leucemias, pero preferiblemente el cáncer de páncreas. No obstante, tal y como muestran a continuación las Tablas 4 y 4-2, muchos de los péptidos acordes con la presente invención también se encuentran en otros tipos de tumor y, por tanto, también pueden ser usados en la inmunoterapia para otras indicaciones. Véanse también la Figura 1 y el Ejemplo 1.

Tabla 4: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer. La tabla contiene una relación de los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumor, sobrerepresentados como mínimo en el 5% de las muestras tumorales analizadas, o presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente de las medias geométricas correspondientes a los tejidos tumorales respecto a las de los tejidos normales superior a 3. La sobrerepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral que en la muestra normal con mayor presentación.

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
3	ALLTFMEQV	Pulmón, riñón, cerebro, colon, recto y esófago
4	SVDVSPPKV	Pulmón, riñón y melanoma
5	LLVDDNFLHTV	Riñón, cerebro, hígado, melanoma y ovario
8	IVDDLTINL	Esófago

9	FLFDGSANLV	Pulmón, colon, recto, mama y esófago
10	FLVDGSSAL	Pulmón, estómago y mama
11	FLYKIIDEL	Pulmón, colon, recto y mama
12	FVSEIVDTV	Pulmón, mama y esófago
14	VLAKEPGVISV	Pulmón
15	SLANNVTSV	Pulmón, riñón, cerebro, estómago, melanoma, ovario y esófago
16	APVNVTTTEVKSV	Leucocitos
21	HLMDQPLSV	Pulmón
23	SLSAFTLFL	Pulmón y próstata
24	GLLEELVTV	Pulmón, estómago y ovario
30	VVDEGPTGV	Pulmón, riñón, cerebro, estómago, hígado, leucocitos, mama y ovario
34	MLMPVHFLL	Estómago
36	KQEYDESGPSIVH	Pulmón y cerebro
39	TLLSNLEEA	Cerebro y próstata
40	FILDSAETTTL	Pulmón
41	FLLDGSEGV	Pulmón, mama, ovario y esófago
42	KLVDKSTEL	Pulmón, colon, recto y esófago
43	RLDQRVPQI	Pulmón, colon, recto, mama y esófago
44	VLLDKIKNLQV	Pulmón, estómago, colon, recto, hígado, mama y melanoma
45	VADKIHSV	Riñón y estómago
47	KMDASLGNLFA	Cerebro
50	ALAAILTRL	Riñón, estómago, colon y recto
51	ALMLQGVDL	Esófago
53	SSFGGLGGGSV	Pulmón
54	YLDAMMNEA	Cerebro, colon, recto, hígado y ovario
58	GLAAFKAFI	Pulmón, riñón e hígado
60	YLEEDVYQL	Pulmón, riñón, colon, recto y mama
64	FLVSNMLLAEA	Próstata
65	YLYDSETKNA	Riñón, colon, recto, hígado, ovario y esófago
66	ALLSGLREA	Riñón, leucocitos y melanoma
67	KMFFLIDKV	Cerebro e hígado
68	KLLTEVHAA	Pulmón, riñón, estómago, colon, recto, hígado, mama y ovario
69	VMAFPTMTI	Pulmón, hígado, próstata, ovario y esófago
70	FLVDGSWSV	Pulmón, estómago, colon, recto, ovario y esófago

71	FLLDGSANV	Pulmón, estómago, colon, recto, hígado, mama, ovario y esófago
72	YVYQNNIYL	Pulmón, estómago, colon, recto, hígado, mama, melanoma, ovario y esófago
73	TLVAIVVGV	Pulmón, riñón, cerebro, estómago, colon, recto, hígado, próstata, mama, ovario y esófago
74	KIQEILTQV	Pulmón, riñón, cerebro, estómago, colon, recto, hígado, leucocitos, ovario y esófago
75	RLDDLKMTV	Pulmón, riñón, colon, recto, ovario y esófago
76	RLLDSVSRL	Pulmón, riñón, colon, recto, hígado y ovario
77	GLTDNIHLV	Pulmón, riñón, colon, recto, ovario y esófago
78	TLSSIKVEV	Pulmón, riñón, estómago, colon, recto, próstata, mama y melanoma
79	VLAPRVLRA	Pulmón, riñón, cerebro, colon, recto e hígado
81	AMSSKFFLV	Pulmón, cerebro, estómago, colon, recto, hígado, próstata y esófago
82	SISDVIAQV	Pulmón, cerebro, colon, recto, hígado y próstata
83	FLIDSSEGV	Pulmón, colon, recto, mama, ovario y esófago
84	NLLDLDYEL	Pulmón, estómago, colon, recto, mama, ovario y esófago
85	TVAEVIQSV	Pulmón y esófago
86	SLLAQNTSWLL	Pulmón, riñón, cerebro, estómago, colon, recto, hígado y melanoma
87	LLLGSPAAA	Cerebro

Tabla 4-2: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer (enmienda de la Tabla 4). La tabla presenta, como la Tabla 4, una relación de los péptidos seleccionados que en otros tipos de tumor se han hallado sobrepresentados (incluida la presentación específica) en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, o presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente de las medias geométricas respecto a las de los tejidos normales superior a 3. La sobrepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral

que en la muestra normal con mayor presentación. Los tejidos normales en los que se contrastó la sobrerepresentación fueron: Tejido adiposo, glándula suprarrenal, células sanguíneas, vaso sanguíneo, médula ósea, cerebro, cartílago, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroidea, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroidea, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
3	ALLTFMEQV	SCLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
4	SVDVSPPKV	Melanoma, cáncer de esófago
5	LLVDDSFLHTV	SCLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
6	VLISLKQAPLV	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
8	IVDDLTINL	NSCLC, cáncer gástrico, melanoma, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, LNH
9	FLFDGSANLV	SCLC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
10	FLVDGSSAL	SCLC, CCR, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
11	FLYKIIDEL	SCLC, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
12	FVSEIVDTV	SCLC, cáncer gástrico, CCR, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
13	LLAGQTYHV	NSCLC, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
14	VLAKPGVISV	Cáncer de mama, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
15	SLANNVTSV	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
16	APVNVTTTEVKSV	LMA
19	HLAPETDEDDL	Cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
20	RLAGDGVGAV	Cáncer de vejiga urinaria

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
21	HLMDQPLSV	Cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
22	TLDGAAVNQV	Cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
23	SLSAFTLFL	SCLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, LNH
24	GLLEELVTV	SCLC, CCR, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
29	FLQEYLDAI	Cáncer de vejiga urinaria
30	VVDEGPTGV	SCLC, CCR, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, LNH
34	MLMPVHFL	Cáncer de mama
37	GLLKKINSV	Cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, cáncer de ovario
38	NLVEKTPALV	LMA
39	TLLSNLEEA	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, LNH
40	FILDSAETTTL	SCLC, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago
41	FLLDGSEGV	SCLC, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
42	KLVDKSTEL	SCLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
43	RLDQRVPQI	SCLC, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
44	VLLDKIKNLQV	SCLC, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, LNH
45	VADKIHSV	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
46	TFAPVNVTTTEV KSV	Cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
47	KMDASLGNLFA	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
50	ALAAILTRL	Cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
51	ALMLQGVDL	Cáncer de mama
53	SSFGGLGGGSV	Cáncer de mama
54	VLLSEIEVA	Melanoma, cáncer de útero
55	YLDAMMNEA	Cáncer de próstata, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
58	GLAAFKAFL	SCLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, LNH, cáncer de ovario
60	YLEEDVYQL	Melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, LNH
64	FLVSNMLLAEA	Cáncer de vejiga urinaria
65	YLYDSETKNA	SCLC, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares
66	ALLSGLREA	Cáncer gástrico, cáncer de mama
67	KMFFLIDKV	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, LNH, cáncer de ovario

NSCLC= cáncer de pulmón amicrocítico, SCLC= cáncer de pulmón microcítico, CCR= cáncer colorrectal, CHC= cáncer hepático, CCM= carcinoma de células de Merkel, LNH= linfoma no hodgkiniano, LMA= leucemia mieloide crónica, LLC= leucemia linfocítica crónica.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 3, 4, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 21, 23, 24, 30, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 50, 53, 58, 60, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85 y 86 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de pulmón.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 3, 4, 5, 15, 30, 45, 50, 58, 60, 65, 66, 68, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 y 86 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de riñón.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 3, 5, 15, 30, 36, 39, 47, 55, 67, 73, 74, 79, 81, 82, 86 y 87 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de cerebro.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84 y 86 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de colon.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 71, 72, 73 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84 y 86 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de recto.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 3, 8, 9, 12, 15, 41, 42, 43, 51, 65, 69, 70, 71, 7273, 74, 75, 77, 81, 83, 84 y 85 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de esófago.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 4, 5, 15, 44, 66, 72, 78, y 86 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del melanoma.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 5, 15, 24, 30, 41, 55, 65, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 83 y 84para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de ovario.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 9, 10, 11, 12, 41, 43, 60, 71, 72, 73, 78, 83 y 84 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de mama.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 5, 30, 44, 55, 58, 65, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 76, 79, 81, 82, 85 y 86 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de hígado.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 10, 15, 24, 30, 34, 44, 45, 50, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 78, 81, 84 y 86 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de estómago.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 23, 39, 64, 69, 73, 78, 81 y 82 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer de próstata.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención seleccionado entre las SEQ ID N.º 16, 30, 66 y 74 para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del cáncer leucocítico.

La presente invención se refiere, además, a péptidos acordes con la presente invención que tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o –en una forma más larga–, como variante de longitud, a una molécula MHC de clase II.

La presente invención se refiere, además, a péptidos acordes con la presente invención en que cada uno de dichos péptidos consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conforme a la presente invención, en que dichos péptidos están modificados y/o incluyen enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conformes a la presente invención, en que dicho péptido es parte de una proteína de fusión, en particular fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii), o fusionado con (o integrado en la secuencia de) un anticuerpo, como por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos acordes con la presente invención. La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico acorde con la presente invención que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar y/o que expresa un ácido nucleico conforme a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en concreto para el tratamiento del cáncer.

La presente invención concierne, además, a anticuerpos específicamente dirigidos contra los péptidos acordes con la presente invención o contra complejos formados por dichos péptidos con el MHC, así como métodos para fabricarlos.

La presente invención concierne, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en concreto de TCR solubles (TCRs) y TCR clonados y sintetizados en linfocitos T autólogos o alogénicos, y a métodos para fabricarlos, así como a linfocitos citolíticos naturales (o células NK) u otro tipo de células que sean portadoras de dichos TCR o reaccionen de forma cruzada con dichos TCR.

Los anticuerpos y los TCR constituyen formas de realización adicionales del uso inmunoterapéutico de los péptidos acordes con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión tal y como se ha descrito antes. La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora acorde con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente es una célula dendrítica.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir un péptido acorde con la presente invención, el cual comprende el cultivo de la célula hospedadora acorde con la presente invención y el aislamiento del péptido de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención en que el antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o de una célula presentadora de antígeno artificial mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, preferiblemente la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 34, o una variante de dichas secuencias de aminoácidos.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos conforme a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos conformes a la presente invención, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T producidos conforme a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al uso como medicamento o en la fabricación de un medicamento de cualquier péptido como los descritos, del ácido nucleico conforme a la presente invención, del vector de expresión conforme a la presente invención, de la célula conforme a la presente invención, del linfocito T activado, del receptor de linfocitos T o del anticuerpo o de otras moléculas que se unan al péptido y/o al complejo péptido-MHC acordes con la presente invención. Preferiblemente, dicho medicamento es activo contra el cáncer.

Preferiblemente, dicho medicamento está destinado a servir como terapia celular, como vacuna o como proteína, o está basado en un TCR soluble o en un anticuerpo.

La presente invención se refiere, además, al uso conforme a la presente invención, en que dichas células cancerosas son de cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, cáncer de colon o recto, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de próstata, melanoma y leucemias, pero preferiblemente son células de cáncer de páncreas.

La presente invención se refiere, además, a biomarcadores basados en los péptidos acordes con la presente invención, aquí denominados «dianas», que pueden ser utilizados para el diagnóstico del cáncer, preferiblemente del cáncer de páncreas. El marcador puede ser una sobrerepresentación del péptido o péptidos en cuestión, o la sobreexpresión del gen o genes correspondientes. Los marcadores también podrían ser utilizados para predecir la probabilidad de éxito de un tratamiento, preferiblemente una inmunoterapia, y más preferiblemente de una inmunoterapia dirigida contra la misma diana que es identificada con el biomarcador. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo

o un TCR soluble para teñir cortes histológicos del tumor con el fin de detectar la presencia de un péptido de interés unido en complejo con un MHC.

Opcionalmente el anticuerpo puede estar dotado de otra función efectora, como es un dominio inmunoestimulante o una toxina.

La presente invención también se refiere al uso de estas nuevas dianas en el contexto del tratamiento del cáncer.

En la siguiente descripción detallada de las proteínas originarias (polipéptidos) de los péptidos conforme a la invención se dan a conocer diversas aplicaciones contra otros tipos de cáncer, tanto terapéuticas como diagnósticas.

El gen ACAT2 codifica la acetil-CoA acetiltransferasa 2, una tiolasa implicada en el metabolismo de los lípidos. La expresión ACAT2 está regulada al alza en el carcinoma hepatocelular (Song et al., 2006). La expresión de ACAT2 ha sido vinculada con radiorresistencia en estirpes celulares de cáncer de páncreas (Soucek et al., 2014).

El gen ACTA1 codifica la actina alfa del músculo esquelético, un miembro de la familia de las actinas, un grupo de proteínas altamente conservadas que intervienen en la motilidad, la estructura y la integridad de la célula. El ACTA1, un marcador mioepitelial clásico, aparece sobreexpresado en los fibroblastos asociados al tumor en el cáncer de vejiga urinaria, el carcinoma epidermoide oral, cáncer de mama invasivo, cáncer gástrico, colangiocarcinoma y carcinoma hepático metastásico, y contribuye a la transición epitelio-mesenquimática, a la formación del estroma tumoral y a la fibrosis (Schulte et al., 2012; Franz et al., 2010; Kuroda et al., 2005; Nakayama et al., 2002; Terada et al., 1996).

El gen ACTA2 codifica la actina alfa del músculo liso, un miembro de la familia de las actinas, un grupo de proteínas altamente conservadas que intervienen en la motilidad, la estructura y la integridad de la célula (RefSeq, 2002). En la leucemia linfocítica crónica, en metástasis cerebrales del cáncer de pulmón amicrocítico y en estirpes celulares de

melanoma metastásico se han descubierto polimorfismos mononucleotídicos o variaciones en el número de copias del gen ACTA2 (Berndt et al., 2013; Lee et al., 2012; Dutton-Regester et al., 2012). Desde el punto de vista funcional, los niveles elevados de expresión de ACTA2 parecen estar asociados con la potenciación de la invasión por las células tumorales y la formación de metástasis (Kojima et al., 2014; Lee et al., 2013b; Tatenhorst et al., 2004).

El gen ACTB codifica la actina beta, uno de los principales componentes del aparato contráctil y una de las dos actinas del citoesqueleto que no se hallan en el músculo (RefSeq, 2002). El ACTB aparece desregulado en el cáncer de hígado, el melanoma, el cáncer de riñón, el cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, leucemia y linfoma. La expresión anómala y la polimerización de ACTB y los cambios resultantes en el citoesqueleto parecen estar vinculados con la invasividad y la metástasis del cáncer (Guo et al., 2013).

El gen ACTBL2 codifica la actina kappa, un miembro de la familia de las actinas, un grupo de proteínas altamente conservadas que interviene en la motilidad, la estructura y la integridad de la célula (RefSeq, 2002). Se ha observado el aumento de la expresión de ACTBL2 en el carcinoma hepatocelular y en células de hepatoma, donde alteró las propiedades de crecimiento celular y contribuyó a un pronóstico postoperatorio negativo (Chang et al., 2006; Chang et al., 2011).

El gen ACTC1 codifica la actina alfa 1 del músculo cardíaco, uno de los principales componentes del aparato contráctil de los cardiomiocitos (RefSeq, 2002). La alteración de la expresión de ACTC1 se ha descrito en el cáncer vesical, en células de cáncer de pulmón amicrocítico tratado con paclitaxel y en el cáncer de ovario quimiorresistente (Zaravinos et al., 2011; Che et al., 2013; Pan et al., 2009). Asimismo, el ACTC1 podría servir como marcador diagnóstico del cáncer de próstata y del rhabdomyosarcoma (Huang et al., 2010; Clement et al., 2003).

El gen ACTG1 codifica la actina gamma 1, una actina citoplasmática presente en células no musculares, que actúa como mediadora de la motilidad interna de la célula (RefSeq, 2002). La ACTG1 aparece sobreexpresada en el cáncer de pulmón microcítico y en el osteosarcoma, y regulada a la baja en el cáncer epitelial de ovario (Li et al., 2010; Jeong et al., 2011; Chow et al., 2010). Se han descrito alteraciones de los niveles de ACTH1 que promueven la invasión y la formación de metástasis en diferentes tipos de células cancerosas. En células de cáncer de colon y de carcinoma hepatocelular la sobreexpresión de ACTG1 potencia la migración y la invasión, en tanto que en las células de melanoma y de adenocarcinoma de glándula salival la regulación a la baja de ACTG1 está asociada con este fenotipo (Simiczyjew et al., 2014; Luo et al., 2014; Zhang et al., 2006; Gutgemann et al., 2001; Suzuki et al., 1998).

El gen ACTG2 codifica la actina gamma 2, una actina del músculo liso presente en los tejidos entéricos y que media en la motilidad interna de la célula (RefSeq, 2002). Se debate el posible papel de ACTG2 como biomarcador para el diagnóstico del cáncer de próstata, pues se ha demostrado su regulación al alza en células del estroma prostático transdiferenciadas (Fillmore et al., 2014; Untergasser et al., 2005). En cuanto a la quimioterapia, el ACTG2 aparece regulado al alza a raíz del tratamiento con paclitaxel en células de cáncer de laringe, parece estar implicado en la resistencia al cisplatino en las células de cáncer de mama y se ha demostrado su correlación positiva con la sensibilidad del cáncer colorrectal con metástasis hepáticas al régimen FOLFOX4 (Xu et al., 2013; Watson et al., 2007; Lu et al., 2013b).

El gen ADAM8 codifica la proteína ADAM 8 con dominio de metalopeptidasa, un miembro de la familia de proteínas con dominio de desintegrina y de metaloproteasa que intervienen en las interacciones entre las células y entre la célula y la matriz extracelular (RefSeq, 2002). La sobreexpresión de ADAM8 en el cáncer de páncreas está asociada con el aumento de la migración y la invasividad en células de adenocarcinoma ductal de páncreas (Schlomann et al., 2015). ADAM8 interviene en la migración y la invasión de las células tumorales en el cáncer de pulmón, el carcinoma de células renales y en cánceres cerebrales (Mochizuki and Okada, 2007).

El gen AEBP1 codifica la proteína de unión al estimulador de adipocitos 1, una carboxipeptidasa A que puede funcionar como un correpresor transcripcional importante para la adipogenia y la diferenciación de los miocitos lisos (RefSeq, 2002). El AEBP1 está regulado al alza en el melanoma y contribuye a la resistencia adquirida contra la inhibición del homólogo B1 del oncogén viral de sarcoma murino v-raf (BRAF) mutante (Hu et al., 2013). AEBP1 aparece regulado al alza en la mayoría de los glioblastomas primarios (Reddy et al., 2008).

El gen AHNK2 codifica la proteína estructural AHNK nucleoproteína 2 (Marg et al., 2010). AHNK2 es un elemento importante de la vía de secreción no clásica del factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGF1), factor implicado en el crecimiento y la invasión tumorales (Kirov et al., 2015).

El gen ANKH codifica el homólogo progresivo de anquilosis (ratón)/regulador del transporte de pirofosfato inorgánico ANKH, una proteína transmembrana de paso múltiple que controla los niveles de pirofosfato (RefSeq, 2002).

El gen ANO1 codifica la anoctamina 1, un canal de cloruros activado por calcio vinculado con el sarcoma del intestino delgado y el cáncer bucal (RefSeq, 2002). ANO1 aparece amplificado en el cáncer epidermoide de esófago (ESCC), el tumor estromal gastrointestinal (GIST), el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC), así como en el cáncer de páncreas y el de mama (Qu et al., 2014).

El gen APOB codifica la apolipoproteína B, la principal apolipoproteína de los quilomicrones y de las lipoproteínas de baja densidad (LDH) (RefSeq, 2002). En el carcinoma hepatocelular (CHC) vinculado con el HBV y negativo para la alfa-fetoproteína, la APOB ha resultado ser una de las 14 proteínas expresadas diferencialmente que podrían estar asociadas con la progresión de dicho cáncer (He et al., 2014). En el cáncer de mama avanzado, APOB ha resultado ser una de las 6

proteínas con expresión diferencial que podrían predecir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y la supervivencia sin recidiva de las pacientes (Hyung et al., 2011).

El gen ASPHD1 codifica la proteína 1 portadora del dominio de aspartato beta-hidroxilasa. El ASPHD1 está localizado en el cromosoma 16p11. 2 (RefSeq, 2002).

El gen ATM codifica la proteína mutada de la ataxia-telangiectasia, un miembro de la familia de las cinasas PI3/PI4 y controlador principal de las vías de señalización de los puntos de control del ciclo celular que son necesarias para activar la respuesta celular al daño del ADN y mantener la estabilidad del genoma (RefSeq, 2002). El ATM es un oncosupresor que aparece mutado con frecuencia en un amplio abanico de tipos de cáncer humanos como el de pulmón, colorrectal, mama y neoplasias hematopoyéticas (Weber and Ryan, 2014).

El gen ATP5B codifica el polipéptido beta de la ATP sintasa, transportadora de H⁺, del complejo mitocondrial F₁, la subunidad beta del centro catalítico de la ATP sintasa mitocondrial (RefSeq, 2002). La expresión génica del ATP5B fue significativamente mayor en tejidos de cáncer colorrectal que en tejidos sanos (Geyik et al., 2014). La regulación a la baja de ATP5B en los tejidos tumorales está estrechamente relacionada con la metástasis, la invasión y el pronóstico negativo en el cáncer de vesícula biliar (Sun et al., 2015b).

El gen ATP5L codifica la subunidad G de la ATP sintasa, transportadora de H⁺, del complejo mitocondrial F₀, el componente inserto en la membrana de la ATP-sintasa mitocondrial, que comprende el canal de protones (RefSeq, 2002).

El gen ATP5L2 codifica la subunidad G2 de la ATP sintasa, transportadora de H⁺, del complejo mitocondrial F₀, el componente inserto en la membrana de la ATP-sintasa mitocondrial, que comprende el canal de protones (RefSeq, 2002).

El gen BACE2 codifica la enzima hidrolítica 2 de la proteína precursora amiloidea (APP) en el punto beta, una glucoproteína integral de membrana y aspartato proteasa. BACE2 escinde la proteína precursora amiloidea convirtiéndola en el péptido amiloide beta (RefSeq, 2002). BACE2 interviene en la función de las células beta del páncreas (Vassar et al., 2014).

El gen CCNB1 codifica la ciclina B1, una proteína reguladora implicada en la mitosis (RefSeq, 2002). CCNB1 es un conocido antígeno tumoral cuya sobreexpresión se ha descrito en el cáncer de mama, de cabeza y cuello, próstata, colorrectal, pulmón e hígado (Egloff et al., 2006).

El gen CEACAM6 codifica la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 6 (antígeno inespecífico de reacción cruzada), perteneciente a la familia de los marcadores tumorales CEACAM (RefSeq, 2002). CEACAM6 está regulado al alza en los tumores gástricos (Yasui et al., 2004). CEACAM6 es un candidato a antígeno tumoral del cáncer mama (Sood, 2010).

El gen CLTA codifica la cadena ligera A de la clatrina, un componente estructural de las depresiones recubiertas con función reguladora (RefSeq, 2002). El gen CLTA presenta una variante de corte y empalme alternativo en el glioma (Cheung et al., 2008).

El gen CLTB codifica la cadena ligera B de la clatrina, un componente estructural de las depresiones recubiertas con función reguladora (RefSeq, 2002).

El gen CLU codifica una chaperona segregada que podría estar implicada en diversos fenómenos biológicos básicos como la muerte celular, la progresión tumoral y los trastornos neurodegenerativos (RefSeq, 2002). Su papel en la oncogenia parece ser ambivalente pues en las células normales y en las primeras fases de la carcinogenia, CLU inhibiría la progresión tumoral, mientras que en la neoplasia avanzada parece conferir una supervivencia sustancialmente mayor al tumor al suprimir muchos factores estresantes terapéuticos y potenciar la metástasis. Se ha demostrado que CLU

desempeña un papel crítico en la patogenia del cáncer de próstata, al regular el comportamiento agresivo de las células del carcinoma de células renales claras humano a través de la modulación de la señalización del ERK1/2 y de la expresión de la MMP-9 y conferir resistencia al tratamiento en los estadios avanzados del cáncer de pulmón (Trougakos, 2013; Panico et al., 2009; Takeuchi et al., 2014; Wang et al., 2014b).

El gen COL12A1 codifica la cadena alfa del colágeno de tipo XII, un miembro de la familia de los colágenos FACIT (colágenos asociados a fibrillas con hélices triples interrumpidas), por lo que forma parte de la matriz extracelular (MEC) (RefSeq, 2002). COL12A1 aparece sobreexpresado en variantes de estirpes celulares del cáncer de ovario que son farmacorresistentes (Januchowski et al., 2014). En el cáncer colorrectal, COL12A1 aparece sobreexpresado en el estroma desmoplásico que envuelve a los fibroblastos asociados con el cáncer, así como en las células cancerosas que revisten el frente de invasión (Karagiannis et al., 2012).

El gen COL6A3 codifica la cadena alfa-3 del colágeno de tipo VI, un colágeno filamentosos y perlado presente en la mayoría de los tejidos conectivos, que desempeña un papel importante en la organización de los componentes de la matriz (RefSeq, 2002). Se ha descrito que la expresión de COL6A3 es elevada en el cáncer de páncreas, en el de colon y en el gástrico, en los carcinomas mucoepidermoides y en el cáncer de ovario. Se han detectado variantes de transcripción asociadas con el cáncer que engloban los exones 3, 4 y 6 en el cáncer de colon, vejiga, próstata y páncreas (Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008). En el cáncer de ovario los niveles de COL6A3 se correlacionaron con un grado tumoral más elevado y, en el cáncer de páncreas, se ha demostrado que podría servir como biomarcador sérico para el diagnóstico (Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014).

El gen DCBLD2 codifica la discoidina o proteína 2 portadora de dominios LCCL y CUB, también llamada proteína similar a neuropilina derivada de la musculatura lisa y del endotelio (ESDN), una proteína transmembrana correceptora (RefSeq, 2002). El

DCBLD2 aparece regulado al alza en los glioblastomas y en el cáncer de cabeza y cuello y es necesario para la oncogenia estimulada por el EGFR (Feng et al., 2014). Además, el DCBLD2 también está regulado al alza en subestirpes y en muestras de tejido del cáncer de pulmón altamente metastásico (Koshikawa et al., 2002). En cambio, su expresión queda silenciada en el cáncer gástrico por la hipermetilación de su promotor (Kim et al., 2008).

El gen DUSP14, la fosfatasa 14 de especificidad doble, puede desfosforilar tanto residuos de tirosina como de serina/treonina e interviene en la inactivación de la señalización de la MAP cinasa (RefSeq, 2002). Polimorfismos mononucleotídicos del gen DUSP14 están vinculados con un riesgo de melanoma alterado (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013a).

El gen EEF1A1 codifica una isoforma de la subunidad alfa del complejo del factor de elongación-1, que es el responsable de la incorporación enzimática de los aminoacil-ARNt al ribosoma (RefSeq, 2002). Se ha demostrado que el EEF1A1 está regulado al alza en diversas entidades tumorales, como el cáncer colorrectal, el cáncer de ovario, el cáncer gástrico, el cáncer de próstata, el glioblastoma y el carcinoma epidermoide, y ha sido descrito como un posible biomarcador sérico del cáncer de próstata (Matassa et al., 2013; Vui-Kee et al., 2012; Lim et al., 2011; Kuramitsu et al., 2010; Kido et al., 2010; Scrideli et al., 2008; Qi et al., 2005; Rehman et al., 2012). El EEF1A1 inhibe la apoptosis a través de la interacción con p53 y p73, fomenta la proliferación por medio de la represión transcripcional del inhibidor del ciclo celular p21 y participa en la regulación de la transición epitelio-mesenquimática (Blanch et al., 2013; Choi et al., 2009; Hussey et al., 2011).

El gen EEF1A1P5 codifica el pseudogén 5 del factor de elongación de la traducción eucariota 1 alfa 1, que está localizado en el cromosoma 9q34.13 (RefSeq, 2002).

El gen FAMC3 pertenece a la familia con similitud de secuencia 3 (FAM3) y codifica una proteína segregada portadora de un dominio GG. Se ha observado un cambio de

expresión de esta proteína en células derivadas del cáncer de páncreas (RefSeq, 2002). En el melanoma, la FAMC3 ha sido identificada como un candidato a biomarcador de la autofagia, un importante mecanismo de supervivencia de las células tumorales (Zou et al., 2002; Kraya et al., 2015). La FAMC3 desempeña un papel esencial en la transición epitelio-mesenquimática que se correlaciona con la malignidad y la progresión metastásica de los tumores, así como con la supervivencia breve, especialmente en el cáncer hepatocelular, el cáncer colorrectal y en tumores de pulmón y mama (Csiszar et al., 2014; Gao et al., 2014c; Song et al., 2014; Chaudhury et al., 2010; Lahsnig et al., 2009).

El gen FAP codifica una proteasa de serina transmembrana que se expresa selectivamente en los fibroblastos estromales reactivos de los tumores epiteliales (fibroblastos asociados al cáncer o CAF), en el tejido de granulación de las heridas en proceso de cicatrización, y en células malignas de los sarcomas óseos y de partes blandas (RefSeq, 2002). FAP cumple un importante papel en el crecimiento del tumor y la metástasis debido a su intervención en la adhesión celular, en los procesos de migración y en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) (Jacob et al., 2012). La sobreexpresión de FAP se correlaciona con un pronóstico malo, la estadificación avanzada del tumor, la formación de metástasis y el potencial invasor en diversos tipos de cáncer, como son el de colon, el carcinoma epidermoide de esófago, el adenocarcinoma de páncreas, glioblastoma, osteosarcoma, el cáncer de ovario y el de mama (Wikberg et al., 2013; Kashyap et al., 2009; Cohen et al., 2008; Mentlein et al., 2011; Yuan et al., 2013; Zhang et al., 2011; Ariga et al., 2001).

El gen FKBP10 codifica la proteína 10 de unión a FK506, que pertenece a la familia de la peptidil-prolil cis/trans isomerasa de tipo FKBP. El producto génico de FKBP10 se localiza en el retículo endoplasmático y actúa como una chaperona molecular (RefSeq, 2002). El FKBP10 ha sido identificado como un nuevo gen que participa en la adquisición y el mantenimiento del fenotipo resistente a la adriamicina en células leucémicas (Sun et al., 2014). El FKBP10 ha sido vinculado con el cáncer colorrectal a través de su

regulación al alza (Olesen et al., 2005). En cambio, su expresión a la baja parece ser característica de los carcinomas epiteliales del ovario (Quinn et al., 2013).

El gen FLNA codifica la filamina A, una proteína unida a actina que entrelaza los filamentos de actina y los une a glucoproteínas de membrana. La proteína codificada interviene en la remodelación del citoesqueleto que provoca cambios en la morfología y en la migración de la célula, e interactúa con integrinas, complejos receptores transmembrana, y segundos mensajeros (RefSeq, 2002). Según su localización dentro de la célula, la filamina tiene un papel ambivalente en el cáncer: En el citoplasma, la filamina A actúa en varias vías de señalización del crecimiento, además de intervenir en vías relacionadas con la migración y la adhesión celular. En definitiva, su sobreexpresión ejerce un efecto promotor del tumor. A diferencia de la filamina A entera, el fragmento C-terminal, que se desprende con la proteólisis de la proteína, está localizado en el núcleo, donde interacciona con factores de transcripción suprimiendo el crecimiento tumoral y la metástasis (Savoy and Ghosh, 2013).

El gen GGA1 codifica un miembro de la familia de la proteína de unión a ARF (GGA), portadora del dominio auricular (*ear domain*) de la gamma-adaptina, localizada en el aparato de Golgi. Los miembros de esta familia son proteínas de recubrimiento (*coat*) ubicuas que regulan el tráfico de proteínas entre la red del trans-Golgi y el lisosoma (RefSeq, 2002).

El gen HBB codifica la cadena beta de la hemoglobina humana, la metaloproteína férrica transportadora de oxígeno del eritrocito (RefSeq, 2002). La capacidad del cáncer de mama para generar metástasis óseas y viscerales es un claro indicador del pobre desenlace clínico en comparación con los casos de ese tipo de cáncer en que las metástasis quedan restringidas al tejido óseo. El aumento de la expresión del HBB en las metástasis óseas guarda relación con su capacidad para extenderse con rapidez a otros órganos (Capulli et al., 2012). Se ha constatado que el HBB se sobreexpresa en el tejido del carcinoma de cuello uterino. La expresión ectópica del HBB en células de

cáncer de cuello uterino abolió el estrés oxidativo y mejoró la viabilidad celular (Li et al., 2013).

El gen HBD codifica la cadena delta de la hemoglobina humana, la metaloproteína férrica transportadora de oxígeno del eritrocito. La hemoglobina A2 está formada por dos cadenas alfa y dos cadenas delta, que con la HbF constituye el 3% de la hemoglobina del adulto (RefSeq, 2002).

El gen HKDC1 codifica la proteína portadora de dominio hexocinasa 1, que muestra la actividad hexocinasa *in vitro* (Guo et al., 2015). Gracias a un nuevo método para descubrir posibles dianas terapéuticas a partir de datos heterogéneos, entre otras dianas conocidas el HKDC1 se erigió como una nueva de tales dianas en el cáncer de pulmón (Li and Huang, 2014).

El gen HSPD1 codifica la proteína 1 de 60 kDa de choque térmico mitocondrial, perteneciente a la familia de la chaperonina, que es esencial para el plegamiento y el ensamblaje de las proteínas recién importadas a las mitocondrias y podría actuar como molécula de señalización en el sistema inmunitario innato (RefSeq, 2002). Aunque a HSPD1 se la considera una proteína del interior de la mitocondria, también ha sido hallada en el citosol, en la membrana celular, en vesículas, en la superficie de la célula, en el espacio extracelular y en la sangre. Puesto que los niveles de la HSPD1 en el citosol aumentan o disminuyen en diversos órganos durante la carcinogénesis, esta proteína puede servir como biomarcador para el diagnóstico y el pronóstico de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas. Además, algunas funciones recientemente descubiertas de la HSPD1 están vinculadas con la carcinogénesis, en concreto con la supervivencia y la proliferación de las células tumorales, por lo que se ha debatido intensamente como diana prometedora del tratamiento antitumoral (Pace et al., 2013; Nakamura and Minegishi, 2013; Cappello et al., 2013; Cappello et al., 2011; Cappello et al., 2008).

El gen HYOU1 codifica la proteína 1 regulada al alza por la hipoxia, más conocida como la proteína regulada por glucosa de 170 kDa (GRP170), que pertenece a la familia de las

proteínas de choque térmico 70. La expresión de HYOU1 se ve estimulada en las condiciones de estrés generadas por la hipoxia y desemboca en la acumulación de la proteína en el retículo endoplasmático. Se cree que la proteína codificada por HYOU1 cumple un importante papel en el plegamiento y la secreción de proteínas en el retículo endoplasmático (RefSeq, 2002). Se ha demostrado que la actividad de la proteína HYOU1 localizada dentro de la célula mejora la supervivencia de las células cancerosas durante la progresión tumoral o la metástasis. La proteína HYOU1 localizada fuera de la célula desempeña un papel esencial en la generación de la respuesta inmunitaria antitumoral al facilitar la liberación de antígenos tumorales para su presentación cruzada (Fu and Lee, 2006; Wang et al., 2014a). La proteína HYOU1 ha sido utilizada en la inmunoterapia contra el cáncer y ha demostrado un efecto inmunomodulador positivo (Yu et al., 2013; Chen et al., 2013a; Yuan et al., 2012; Wang and Subjeck, 2013). En células de cáncer de próstata, la supresión de HYOU1 reveló un efecto antitumoral (Miyagi et al., 2001).

El gen IFT88 codifica un miembro de la familia con repetición del tetratricopéptido (TPR) (RefSeq, 2002). En la mitosis, el IFT88 es parte de un complejo regido por la dineína 1 que transporta los grupos de microtúbulos periféricos hasta los polos del huso para asegurar la orientación adecuada de éste. La eliminación de la IFT88 provoca defectos mitóticos en células cultivadas humanas (Delaval et al., 2011). La pérdida de la expresión génica de IFT88 (también llamado Tg737) desemboca en la proliferación de células madre hepáticas (células ovals) y por tanto actúa como un gen oncosupresor de la neoplasia hepática (Isfort et al., 1997). En 2012 se descubrió una mutación que es responsable de una nueva forma de ciliopatía y anosmia en humanos que se ha podido remediar en ratones con terapia génica mediante vectores adenovíricos (McIntyre et al., 2012).

El gen IGF2BP3 codifica la proteína de unión 3 al ARNm del factor de crecimiento insulinoide II, una proteína oncofetal, que reprime la traducción del factor de crecimiento insulinoide II (RefSeq, 2002). Diversos estudios han demostrado que la IGF2BP3 actúa en varios aspectos importantes de la función celular, como son la polarización, la

migración, la morfología, el metabolismo, la proliferación y la diferenciación celulares. Estudios *in vitro* han demostrado que la IGF2BP3 promueve la proliferación, la adhesión y la invasión celular. Además, se ha demostrado su relación con los tumores agresivos y avanzados (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014). La sobreexpresión de IGF2BP3 ha sido descrita en numerosos tipos de tumores como relacionada con un mal pronóstico, estadio tumoral avanzado y metástasis, como por ejemplo en el neuroblastoma, el carcinoma colorrectal, el colangiocarcinoma intrahepático, el carcinoma hepatocelular, el cáncer de próstata y el carcinoma de células renales (Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013b; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013b; Yuan et al., 2009).

El gen ITGB4 codifica una proteína de la familia de las integrinas. Las integrinas son heterodímeros compuestos por subunidades alfa y beta que están unidos de forma no covalente a receptores glucoproteicos transmembranales. Median en la adhesión entre la célula y la matriz y entre una célula y otra, y transducen señales que regulan la expresión génica y el crecimiento celular (RefSeq, 2002). La ITGB4 (también llamada CD104) tiende a estar asociada con la subunidad alfa 6 y es probable que tenga una función esencial en la biología de varios carcinomas invasivos como el carcinoma epidermoide de esófago, y el carcinoma vesical o de ovario (Kwon et al., 2013; Pereira et al., 2014; Chen et al., 2014b). Un polimorfismo mononucleotídico del ITGB4 parece influir en la agresividad del tumor y en la supervivencia, y podría tener valor pronóstico para las pacientes con cáncer de mama (Brendle et al., 2008).

El gen KCNK6 codifica uno de los miembros de la superfamilia de las proteínas de los canales de potasio que contienen dos dominios P formadores del poro. Esta proteína de canal, considerada un rectificador abierto, se expresa ampliamente. Es estimulada por el ácido araquidónico, e inhibida por la acidificación interna y los anestésicos volátiles (RefSeq, 2002). La KCNK6 (también llamada K2P6. 1) junto con las K2P1. 1, K2P3. 1, K2P5. 1, K2P6. 1, K2P7. 1 y K2P10. 1 presentan una significativa expresión a la baja en diversos tipos de cáncer a juzgar por un examen de la base de datos en línea de micromatrices de cáncer Oncomine (www.oncomine.org) (Williams et al., 2013).

El gen KCNN3 pertenece a la familia KCNN de canales de potasio. Codifica una proteína integral de membrana que forma un canal activado por calcio independiente de voltaje, que supuestamente regula la excitabilidad neuronal al contribuir al componente lento de la hiperpolarización postsináptica (RefSeq, 2002). La expresión de KCNN3 (también llamada TASK-1) es regulada a la baja por el 17beta-estradiol en células N2A de neuroblastoma de ratón y potencia la proliferación celular (Hao et al., 2014). La expresión de KCNN3 apareció regulada al alza por la exposición de un cultivo organotípico de cáncer de mama a la 1,25-dihidroxitamina D (3) en concentraciones fisiológicas y suprafisiológicas (Milani et al., 2013). La KCNN3 (también llamada K2P3.1) junto con la K2P1.1 y la K2P12.1, aparecieron sobreexpresadas en diversos tipos de cáncer en un examen de la base de datos en línea de micromatrices de cáncer Oncomine (www.oncomine.org) (Williams et al., 2013).

El gen KDM1A (también llamado LSD1) codifica una proteína nuclear que contiene un dominio SWIRM, un motivo de unión a FAD y un dominio aminooxidasa. Esta proteína es un componente de varios complejos de histona desacetilasas, a pesar de que silencia los genes actuando como una histona desmetilasa (RefSeq, 2002). La sobreexpresión de KDM1A fomenta la proliferación de las células tumorales, su migración e invasión, y ha aparecido relacionada con un mal pronóstico en el cáncer de pulmón amicrocítico y el carcinoma hepatocelular (Lv et al., 2012; Zhao et al., 2013). La expresión elevada de KDM1A se correlaciona con la recurrencia del cáncer de próstata y con el aumento de la expresión de VEGF-A (Kashyap et al., 2013). La inhibición de KDM1A con una combinación de tricostatina A (TSA) y 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) suprime la oncogenicidad de la estirpe celular de líquido ascítico del cáncer de ovario SKOV3 (Meng et al., 2013).

El gen KIF26B codifica un miembro de la superfamilia de proteínas de la cinesina (KIF) que es esencial para el desarrollo renal. La expresión de KIF26B está restringida al mesénquima metanéfrico, y su transcripción está regulada por el regulador transcripcional con dedos de zinc Sall1 (Terabayashi et al., 2012). La expresión elevada

de KIF26B en el cáncer de mama está vinculada con un mal pronóstico (Wang et al., 2013b). La regulación al alza de KIF26B se ha correlacionado significativamente con el tamaño tumoral al analizar parejas de tejido tumoral colorrectal y mucosa normal adyacente. La KIF26B juega un importante papel en la carcinogenia colorrectal y actúa como un nuevo indicador pronóstico y una posible diana terapéutica del cáncer colorrectal (Wang et al., 2015).

El gen KRT19 codifica un miembro de la familia de la queratina. Las queratinas son proteínas de los filamentos intermedios responsables de la integridad estructural de las células epiteliales y se dividen a su vez en citoqueratinas y en queratinas del pelo. La KRT19 se expresa específicamente en el peridermo, la capa superficial transitoria que envuelve la epidermis durante el desarrollo (RefSeq, 2002). La expresión de KRT19 en las células tumorales es un marcador pronóstico de varias entidades tumorales como el cáncer de mama, pulmón, ovario y hepatocelular (Skondra et al., 2014; Gao et al., 2014b; Liu et al., 2013b; Lee et al., 2013a). El KRT19 ha demostrado ser un factor pronóstico independiente de los tumores neuroendocrinos pancreáticos, especialmente de los tumores insulino-negativos. Los tumores positivos para la KRT19 están asociados con un desenlace malo independientemente de los parámetros patológicos establecidos, como son el tamaño, la invasión linfovascular y la necrosis (Jain et al., 2010).

El gen KRT7 codifica un miembro de la familia de genes de la queratina. Las citoqueratinas de tipo II consisten en proteínas básicas o neutras que están dispuestas en parejas de cadenas heterotípicas de queratina que se co-expresan durante la diferenciación de los tejidos epiteliales simples y estratificados. Esta citoqueratina de tipo II se expresa específicamente en los epitelios simples que recubren las cavidades de los órganos internos y en los conductos glandulares y los vasos sanguíneos (RefSeq, 2002). La KRT7 se usa en inmunohistoquímica como diferenciador entre varios fenotipos y como biomarcador para el pronóstico de ciertos tipos de cáncer como el carcinoma de células renales, el carcinoma de ovario, tumor cutáneo epitelial, etc. (Kuroda et al., 2013; McCluggage and Young, 2005; Alhumaidi, 2012).

El gen LAMC2 pertenece a la familia de las lamininas, una familia de glucoproteínas de la matriz extracelular. Las lamininas son el principal constituyente de las membranas basales, aparte del colágeno. Han sido implicadas en una amplia variedad de procesos biológicos como la adhesión, diferenciación, migración y señalización celulares, el crecimiento de las neuritas y la metástasis. LAMC2 codifica una proteína que se expresa en varios tejidos fetales y que está localizada específicamente en células epiteliales de la piel, el pulmón y el riñón (RefSeq, 2002). LAMC2 se expresa cuantiosamente en el carcinoma anaplásico de tiroides y está asociada con la progresión, migración e invasión tumoral al modular la señalización del EGFR (Garg et al., 2014). La expresión de LAMC2 predijo un pronóstico más negativo en pacientes con cáncer colorrectal en estadio II (Kevans et al., 2011). A la expresión de LAMC2, junto con la de otros tres biomarcadores, se la ha vinculado con la presencia de metástasis ganglionar en pacientes con carcinoma epidermoide oral (Zanaruddin et al., 2013).

El gen LUM codifica un miembro de la familia de los proteoglucanos pequeños ricos en leucina (SLRP), que engloba a la decorina, el biglucano, la fibromodulina, el keratocán, el epificán y la osteoglicina. El lumicán es el principal proteoglucano de sulfato de queratano de la córnea, aunque también aparece en matrices de colágeno intersticial de todo el cuerpo. El lumicán podría regular la organización de las fibrillas de colágeno y el crecimiento circunferencial, la transparencia de la córnea, y la migración de las células epiteliales y la reparación de tejidos (RefSeq, 2002). La proteína LUM aparece regulada al alza en mucho tejidos tumorales como los de cáncer de mama, colorrectal y de páncreas en comparación con el tejido normal, y está asociada con un grado tumoral superior y un desenlace malo. Con todo, el lumicán extracelular inhibe el crecimiento de las células de cáncer de páncreas y está vinculado con la supervivencia prolongada tras la extirpación quirúrgica (Leygue et al., 1998; Seya et al., 2006; Ishiwata et al., 2007; Li et al., 2014). LUM y otros genes relacionados con la integridad de la matriz extracelular (DCN y DPT) se expresan diferencialmente y podrían servir como biomarcadores del tumor óseo de células gigantes recurrente y metastásico (Lieveld et al., 2014). LUM aparece regulado a la baja en variantes de la estirpe celular de cáncer de ovario A2780

que son resistentes al cisplatino, a la doxorubicina, al topotecán y al paclitaxel (Januchowski et al., 2014).

El gen MAP4 codifica una importante proteína asociada a los microtúbulos no neuronales, que promueve el ensamblaje de los microtúbulos y contrarresta la desestabilización catastrófica de los mismos que se produce en la interfase. La fosforilación de esta proteína afecta a las propiedades de los microtúbulos e influye en la progresión del ciclo celular (RefSeq, 2002). Se ha demostrado que los niveles elevados de MAP4 se correlacionan positivamente con el grado en el cáncer vesical, mientras que la fosforilación de la proteína por parte de la proteína-kinasa A reduce la migración y la invasión de las células del tumor vesical (Ou et al., 2014). Un estudio en pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico describió un aumento del cociente de MAP4 con el ARNm de la estamina (*stathmin*) en muestras tumorales con respecto a muestras normales, lo cual indica que este cociente podría servir como biomarcador del cáncer de pulmón amicrocítico (Cucchiarelli et al., 2008). Los niveles de MAP4, que están regulados negativamente por el oncosupresor p53, influyen en la eficacia de los agentes dirigidos contra los microtúbulos. Los niveles elevados potencian el efecto de los fármacos que estabilizan los microtúbulos (taxanos) y reducen el de los fármacos que los desestabilizan (alcaloides de la vinca), mientras que los niveles bajos de MAP4 ejercen el efecto opuesto (Hait and Yang, 2006; Galmarini et al., 2003; Zhang et al., 1999).

El gen de MMP7 codifica una enzima que degrada los proteoglucanos, la fibronectina, la elastina y la caseína, y que difiere de la mayoría de los miembros de la familia MMP porque carece del dominio proteico conservado C-terminal. Las proteínas de la familia de las metaloproteinasas de matriz (MMP) están implicadas en la descomposición de la matriz extracelular en los procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de los tejidos, así como en procesos patológicos, como la artritis y la metástasis (RefSeq, 2002). La MMP7 aparece sobreexpresada con frecuencia en el tejido canceroso humano, entre ellos en el cáncer colorrectal, el carcinoma de pulmón metastásico y en el cáncer gástrico, y está asociado con la progresión tumoral y la formación de metástasis (li et al., 2006; Sun et al., 2015a; Han

et al., 2015; Long et al., 2014). La MMP7 ha demostrado importantes acciones promotoras del tumor, como la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, la activación de la proliferación de las células tumorales al aumentar la biodisponibilidad del factor de crecimiento insulinoide y del factor de crecimiento epidérmico unido a la heparina y la inducción de la apoptosis en las células adyacentes al tumor por la escisión del ligando Fas unido a la membrana (Li et al., 2006).

El gen MROH6, también llamado C8orf73, está localizado en el cromosoma 8q24. 3 (RefSeq, 2002).

El gen MX1 codifica una proteína metabolizadora del trifosfato de guanosina (GTP) que es activada por los interferones de tipo I y tipo II y que participa en la respuesta antivírica de la célula (RefSeq, 2002). La función del MX1 en el cáncer no se ha dilucidado aún. Por un lado, la expresión del MX1 se correlaciona con el cáncer de próstata, reduce la formación de metástasis y potencia la sensibilidad al docetaxel. Asimismo, se ha detectado la represión epigenética del MX1 por hipermetilación en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, y que la expresión del MX1 reduce la motilidad celular y la invasión tumoral en estirpes celulares de cáncer de próstata y melanoma, todo lo cual apunta a un efecto oncosupresor del MX1 (Brown et al., 2015; Calmon et al., 2009; Mushinski et al., 2009). Por otro lado, un polimorfismo mononucleotídico del gen MX1 se vincula con el cáncer de próstata y la expresión elevada de MX1 está asociada con la metástasis ganglionar en el cáncer colorrectal, lo que señala a este como dotado de propiedades oncogénicas (Croner et al., 2014; Glymph et al., 2013).

El gen MXRA5 codifica una de las proteínas asociadas a la remodelación de la matriz, que contiene 7 repeticiones ricas en leucinas y 12 dominios de tipo C2 similares a inmunoglobulinas relacionados con el perlecán (RefSeq, 2002). Un estudio chino identificó al MXRA5 como el segundo gen mutado con más frecuencia en el cáncer de pulmón amicrocítico (Xiong et al., 2012). En el cáncer de colon, se ha demostrado que el MXRA5 está sobreexpresado y que podría servir como biomarcador para el diagnóstico precoz y la metástasis epiploica (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

El gen MYH9 codifica una cadena pesada IIA de la miosina no muscular convencional que contiene un dominio IQ y un dominio similar a la cabeza de la miosina que interviene en varias funciones importantes, como la citocinesis, la motilidad celular y el mantenimiento de la morfología celular (RefSeq, 2002). La expresión elevada de MYH9 ha demostrado estar asociada con un mal pronóstico en el carcinoma epidermoide de esófago y, en combinación con la anexina II y kindling-2, podría servir como biomarcador predictivo de la supervivencia global y libre de enfermedad en dicho cáncer (Xia et al., 2012; Cao et al., 2014). Se han descubierto mutaciones del gen MYH9 en muestras de cáncer de mama humano y su expresión diferencial en el carcinoma de colon (Ellis et al., 2012; Mu et al., 2013). Los estudios *in vitro* y con xenoinjertos indican que MYH9 promueve el crecimiento y la invasión de diferentes estirpes de células tumorales, como en células de cáncer de mama y de cáncer de pulmón amicrocítico (Robinson et al., 2013; Lin et al., 2013a; Lund et al., 2012; Derycke et al., 2011; Medjkane et al., 2009).

El gen MYL12A codifica una cadena ligera reguladora de la miosina no sarcomérica, que regula la contracción de la musculatura lisa y de células no musculares (Amatschek et al., 2004; RefSeq, 2002). Se ha descrito que la fosforilación de MYL12A fomenta la motilidad y la invasión de las células tumorales en condiciones *in vitro* y en un modelo animal (Manning, Jr. et al., 2000; Kaneko et al., 2002; Khuon et al., 2010). Además, el MYL12A parece regular la reparación de los daños del ADN y la apoptosis inducida por la p53, al secuestrar el regulador transcripcional llamado factor de transcripción antagonista de la apoptosis (Hopker et al., 2012a; Hopker et al., 2012b).

El gen MYL12B codifica una cadena ligera reguladora de la miosina no muscular II (MYH9). La fosforilación de la MYL12B incrementa la actividad de la MgATPasa y el ensamblaje de los filamentos de miosina II (RefSeq, 2002). La proteína está regulada al alza en el cáncer de ovario de grado 3, y el bloqueo farmacológico de la fosforilación o activación del MYL12B reduce la migración y la invasión de las células tumorales en condiciones *in vitro*, así como la formación de metástasis en un modelo animal del cáncer

de mama. Estos datos apuntan al papel prometastásico del MYL12B (Lim et al., 2011; Menhofer et al., 2014; Zhang et al., 2013; Patel et al., 2012).

El gen PARD3B codifica una proteína que se localiza en las zonas de oclusión de las células epiteliales y participa en el establecimiento de la polaridad celular (Izaki et al., 2005). Un polimorfismo mononucleotídico del gen PARD3B está asociado significativamente con la hepatotoxicidad farmacológica en niños con leucemia linfoblástica aguda o linfoma linfoblástico (Horinouchi et al., 2010).

El gen PDIA6 (también llamado ERp5) codifica una proteína disulfuro isomerasa residente en el retículo endoplasmático (RE) que cataliza la formación, reducción e isomerización de los enlaces disulfuro en las proteínas, y que se cree que interviene en el plegamiento de las proteínas unidas por tales enlaces (RefSeq, 2002). La inmunotinción de micromatrices de tejido prostático con PDIA6 mostró una inmunorreactividad superior en lesiones premalignas respecto al epitelio no maligno ($P < 0,0001$, prueba de la U de Mann-Whitney), y en tumores con grado Gleason alto (4-5) frente a grado bajo (2-3) ($P < 0,05$) (Glen et al., 2010). La expresión elevada de ERp5/ADAM10 conduce a la secreción de MICA y altera el reconocimiento de los ligandos de NKG2D en el microentorno ganglionar del linfoma de Hodgkin. Esto desemboca en la modulación a la baja de la expresión de NKG2D en la superficie de los linfocitos T CD8 y en una respuesta antitumoral ineficaz (Zocchi et al., 2012). Las enzimas disulfuro isomerasas PDIA4 y PDIA6 median en la resistencia contra la muerte celular inducida por el cisplatino en el adenocarcinoma de pulmón (Horibe et al., 2014).

El gen PIK3IP1 codifica la proteína interactuante 1 con la fosfoinosítido-3-cinasa, un inhibidor de la PI3K (RefSeq, 2002). La regulación a la baja de PIK3IP1 refuerza el crecimiento tumoral en células de linfoma linfoblástico de linfocitos T humanos (Wong et al., 2014). El PIK3IP1 está regulado a la baja en el carcinoma hepatocelular (CHC) y suprime el desarrollo de este tipo de cáncer (He et al., 2008).

El gen PLEC codifica la plectina, un miembro de la familia de la plaquina, una proteína involucrada en el entrecruzamiento y la organización del citoesqueleto y de los complejos de adhesión (Bouameur et al., 2014). PLEC aparece sobreexpresada en el adenocarcinoma colorrectal, el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello y el cáncer de páncreas (Lee et al., 2004; Katada et al., 2012; Bausch et al., 2011).

El gen POTEE codifica el miembro E de la familia con dominio de anquirina POTE, uno de los 13 parálogos que pertenecen a la familia génica POTE. Se cree que los genes POTE representan una nueva familia de antígenos cáncer-testículo. La función biológica de la familia de genes POTE no se conoce con pleno detalle todavía, pero ciertos indicios sugieren un papel proapoptótico (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). El POTEE se expresa predominantemente en el cáncer de próstata, mama, colon, pulmón y ovario (Bera et al., 2006). Un estudio describió un vínculo estrecho de POTEE con el cáncer de mama usando un abordaje transcriptómico y proteómico combinado (Cine et al., 2014).

El gen POTEF codifica el miembro F de la familia con dominio de anquirina POTE, uno de los 13 parálogos que pertenecen a la familia génica POTE. Se cree que los genes POTE representan una nueva familia de antígenos cáncer-testículo. La función biológica de la familia de genes POTE no se conoce con pleno detalle todavía, pero ciertos indicios sugieren un papel proapoptótico (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). Se ha demostrado que el POTEF induce la apoptosis en células Hela a través de una vía mitocondrial (Liu et al., 2009). El POTEF se expresa predominantemente en el cáncer de próstata, mama, colon, pulmón y ovario (Bera et al., 2006).

El gen POTEI está localizado en el cromosoma 2q21. 1 y codifica el miembro I de la familia con dominio de anquirina POTE, uno de los 13 parálogos que pertenecen a la familia génica POTE. Se cree que los genes POTE representan una nueva familia de antígenos cáncer-testículo. La función biológica de la familia de genes POTE no se conoce con pleno detalle todavía, pero ciertos indicios sugieren un papel proapoptótico (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). El POTEI se expresa predominantemente en el cáncer de próstata, mama, colon, pulmón y ovario (Bera et al., 2006).

El gen POTEJ codifica el miembro J de la familia con dominio de anquirina POTE, uno de los 13 parálogos que pertenecen a la familia génica POTE. Se cree que los genes POTE representan una nueva familia de antígenos cáncer-testículo. La función biológica de la familia de genes POTE no se conoce con pleno detalle todavía, pero ciertos indicios sugieren un papel proapoptótico (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). El POTEJ se expresa predominantemente en el cáncer de próstata, mama, colon, pulmón y ovario (Bera et al., 2006).

El gen POTEKP codifica el miembro K de la familia con dominio de anquirina POTE, un pseudogén que está localizado en el cromosoma 2q21. 1 (RefSeq, 2002).

El gen POTEM codifica el miembro M de la familia con dominio de anquirina POTE, uno de los 13 parálogos que pertenecen a la familia génica POTE. Se cree que los genes POTE representan una nueva familia de antígenos cáncer-testículo. La función biológica de la familia de genes POTE no se conoce con pleno detalle todavía, pero ciertos indicios sugieren un papel proapoptótico (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEM ha sido identificado como transcrito específico del tejido prostático normal y maligno (Stolk et al., 2004).

El gen PTRF codifica el factor liberador de la polimerasa I y del transcrito, un regulador de la transcripción del ARNr que promueve la disociación de los complejos de transcripción y el reinicio de la polimerasa I en los transcritos nacientes del ARNr (RefSeq, 2002). El PTRF está regulado a la baja en estirpes celulares de cáncer de mama y en tejido tumoral de mama (Bai et al., 2012). Es un biomarcador del cáncer de pulmón amicrocítico (Gamez-Pozo et al., 2012). La expresión del PTRF aparece regulada a la baja en el cáncer de próstata y su ausencia en células de cáncer de próstata contribuye significativamente a la progresión y la metástasis del tumor al promover el potencial angiogénico de las células cancerosas (Nassar et al., 2013).

El gen PUS7L codifica la proteína similar al homólogo de la pseudouridilato sintasa 7 (*S. cerevisiae*), una proteína con posible actividad de pseudouridina sintasa. El gen PUS7L está localizado en el cromosoma 12q12 (RefSeq, 2002).

El gen RAN codifica RAN, un miembro de la familia del oncogén RAS, una proteína pequeña de unión a GTP que interviene en la translocación del ARN y de las proteínas a través del complejo del poro nuclear, en el control de la síntesis del ADN y en la progresión del ciclo celular, en la formación y la organización de la red de microtúbulos, y en la activación del receptor de andrógenos (RefSeq, 2002). RAN es una proteína clave en la progresión metastásica del cáncer. RAN aparece sobreexpresada en diversos tipos de tumores, como los de mama y los renales (Matchett et al., 2014).

El gen RANP1 codifica RAN, el pseudogén 1 miembro de la familia del oncogén RAS, un pseudogén localizado en el cromosoma 6p21. 33 (RefSeq, 2002).

El gen RASA4 codifica el activador 4 de la proteína p21 de RAS, proteína activadora de RasGTPasa dependiente de Ca^{2+} que inactiva la vía de Ras-MAPK en respuesta al Ca^{2+} (RefSeq, 2002). RASA4 está notablemente amplificado en el linfoma primario de cavidades (Roy et al., 2011). RASA4 se expresa diferencialmente en el adenocarcinoma de endometrio comparado con el endometrio normal (Jeda et al., 2014).

El gen RASA4B codifica el activador 4B de la proteína p21 RAS, proteína activadora de la RasGTPasa dependiente de Ca^{2+} posiblemente implicada en la regulación de la vía de Ras-MAPK (RefSeq, 2002).

El gen RCN1 codifica la reticulocalbina 1, una proteína de unión a calcio dotada con un dominio de mano EF al cual se une dicho elemento, localizada en la luz del retículo endoplasmático. RCN1 aparece asociada con la membrana plasmática en estirpes de células endoteliales y de cáncer de próstata humanas (RefSeq, 2002). RCN1 aparece sobreexpresado en el cáncer de mama (Amatschek et al., 2004).

El gen RGS4 codifica el regulador 4 de la señalización a través de proteína G, una proteína activadora de la GTPasa (GAP) que actúa sobre las subunidades alfa de las proteínas G heterotriméricas (RefSeq, 2002). RGS4 reveló una regulación a la baja estadísticamente significativa en las metástasis hepáticas y en el frente de invasión del tumor en comparación con el tumor primario de páncreas (Niedergethmann et al., 2007). RGS4 aparece sobreexpresada con mucha frecuencia en el carcinoma de tiroides, aunque no se expresa en los tejidos humanos normales (Nikolova et al., 2008). El transcrito de RGS4 ha sido detectado en células epiteliales inmortalizadas pero no cancerosas de la superficie del ovario en niveles que superan en varios miles de veces la expresión observada en estirpes de células de cáncer de ovario (Hurst et al., 2009).

El gen RPS6 codifica la proteína ribosómica S6, una proteína ribosómica del citoplasma que es un componente de la subunidad 40S de los ribosomas. RPS6 podría contribuir al control del crecimiento y de la proliferación celular a través de la traducción selectiva de ciertas clases de ARNm (RefSeq, 2002). RPS6 es una diana ulterior (situada aguas abajo) del mTOR y ha sido vinculada con múltiples funciones fisiológicas y fisiopatológicas (Chen et al., 2014a). La fosforilación de RPS6 atenúa el daño del ADN y la oncosupresión durante el desarrollo del cáncer de páncreas (Khalaileh et al., 2013).

El gen RPS8 codifica la proteína ribosómica S8, una proteína ribosómica del citoplasma que es un componente de la subunidad 40S de los ribosomas. La expresión de RPS8 aumenta en los tumores colorrectales y en los pólipos del colon en comparación con la mucosa colónica normal del mismo individuo (RefSeq, 2002). La regulación al alza del RPS8 en pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas se correlaciona con la supervivencia a corto plazo (Chen et al., 2015).

El gen RPS8P10 codifica el pseudogén 10 de la proteína ribosómica S8, un pseudogén localizado en el cromosoma 15q11. 2 (RefSeq, 2002).

El gen SCG5 codifica la secretogranina V (proteína 7B2), una proteína secretora neuroendocrina (Portela-Gomes et al., 2008). La duplicación que abarca el extremo 3'

del gen SCG5 y una región situada antes del locus GREM1 (aguas arriba) puede aumentar el riesgo de cáncer colorrectal (Jaeger et al., 2012; Yang et al., 2014b).

El gen SERPINB2 codifica el miembro 2 del inhibidor de la serpina peptidasa, clado B (ovoalbúmina), un inhibidor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa-proteasa extracelular y del activador del plasminógeno tisular (Schroder et al., 2014). SERPINB2 se expresa en diferentes tipos de tumores. La expresión de SERPINB2 está asociada con el pronóstico favorable en los tumores de mama y páncreas, pero con un pronóstico malo en el cáncer de endometrio, de ovario y colorrectal (Schroder et al., 2014).

El gen SERPINB3 codifica el inhibidor de la serpina peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 3, un inhibidor de proteasas (RefSeq, 2002). SERPINB3 es un factor sensible a Ras que desempeña un papel importante en la producción de citocinas asociada a Ras y en la oncogenia (Catanzaro et al., 2014). La expresión de SERPINB3 está regulada al alza en el carcinoma hepatocelular (Pontisso, 2014). SERPINB3 está asociado con el desarrollo del cáncer de ovario (Lim and Song, 2013).

El gen SERPINB4 codifica el inhibidor de la serpina peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 4, un inhibidor de proteasas (RefSeq, 2002). SERPINB4 es un factor sensible a Ras que desempeña un papel importante en la producción de citocinas asociada a Ras y en la oncogenia (Catanzaro et al., 2014). La expresión de SERPINB4 está regulada al alza en el carcinoma hepatocelular (Pontisso, 2014).

El gen SERPINH1 codifica el inhibidor de serpina peptidasa, clado H (proteína de choque térmico 47), miembro 1, (proteína de unión a colágeno 1), un inhibidor de proteinasas de serina. La SERPINH1 actúa como una chaperona molecular específica del colágeno en el retículo endoplasmático (RefSeq, 2002). La SERPINH1 aparece sobreexpresada en muchos cánceres humanos, como el cáncer de estómago, cáncer de pulmón, adenocarcinoma ductal de páncreas, glioma y los carcinomas relacionados con la colitis ulcerosa (Zhao et al., 2014).

El gen SEZ6L codifica el pseudohomólogo (ratón) 6 relacionado con las convulsiones, una proteína transmembrana con múltiples dominios implicada en la interacción entre proteínas y en la transducción de señales (Nishioka et al., 2000). SEZ6L está hipermetilado en el cáncer gástrico (Kang et al., 2008). La expresión de SEZ6L está regulada al alza en estirpes de cáncer de pulmón amicrocítico y microcítico, así como en muestras de tumor primario en comparación con los tejidos normales de pulmón (Gorlov et al., 2007).

El gen SLC16A3 codifica el miembro 3 de la familia de transportadores de solutos 16, un transportador de monocarboxilato ligado a protones (RefSeq, 2002). Se sabe que la mayoría de los tumores sólidos dependen de la glucólisis para la producción de energía. La glucólisis acelerada incrementa la producción de lactato, hecho que ha sido vinculado con un desenlace clínico negativo y con la contribución directa al crecimiento y la progresión del tumor. El SLC16A3 es uno de los pocos transportadores de monocarboxilato que facilita la exportación del lactato en las células cancerosas (Dhup et al., 2012; Draoui and Feron, 2011). La expresión del SLC16A3 ha sido asociada con un mal pronóstico en los pacientes con cáncer hepatocelular y con el aumento de la proliferación, la migración y la invasión celular en experimentos con estirpes celulares (Gao et al., 2014a). La implicación funcional del SLC16A3 en la oncogenia ha sido demostrada en un subgrupo de cáncer de páncreas (Baek et al., 2014).

El gen MTCL1 codifica el factor de entrecruzamiento de microtúbulos 1. Se ha demostrado que el MTCL1 interviene en la remodelación de los microtúbulos dependiente de la polaridad, y media en la reorganización de los microtúbulos no centrosómicos específica de las células epiteliales a través de su actividad formadora de enlaces transversales entre ellos (Sato et al., 2013).

El gen SST codifica la preproteína de la hormona somatostatina. La somatostatina se expresa en todo el cuerpo e inhibe la liberación de numerosas hormonas secundarias. Esta hormona es una importante reguladora del sistema endocrino a través de sus interacciones con la somatotropina hipofisaria, la tirotropina, y la mayoría de las

hormonas del tubo digestivo. La somatostatina también influye en las tasas de neurotransmisión en el sistema nervioso central y en la proliferación de las células normales y oncogénicas (RefSeq, 2002). Los análogos de la SST se han usado con éxito y se investigan como abordaje terapéutico en el tratamiento de los tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos (carcinoides), el cáncer hepatocelular y el cáncer de mama (Pivonello et al., 2014; Culler, 2011; Appetecchia and Baldelli, 2010; Modlin et al., 2010; Watt et al., 2008).

El gen THY1 es candidato a ser un gen oncosupresor en el carcinoma nasofaríngeo dotado de actividad anti-invasiva (Lung et al., 2010).

El gen TSC22D4 codifica una proteína que pertenece a la familia con dominio TSC22 de los reguladores transcripcionales con cremallera de leucina (RefSeq, 2002). Los niveles hepáticos de TSC22D4 aparecieron aumentados en la caquexia por cáncer (Jones et al., 2013).

El gen TUBA1A codifica la tubulina, alfa 1a. La expresión de TUBA1A se detecta predominantemente en células neurológicas morfológicamente diferenciadas. Las mutaciones de este gen causan lisencefalia de tipo 3 (LIS3) – un trastorno neurológico caracterizado por microcefalia, retraso mental y epilepsia precoz, causado por defectos en la migración neuronal (RefSeq, 2002). La desregulación de la expresión de TUBA1A y de ciertos otros genes, causada por las recombinaciones cromosómicas en estirpes de células de mama oncogénicas y transformadas por radiación, podría reflejar eventos moleculares tempranos de la carcinogénesis mamaria (Unger et al., 2010). Con el análisis proteómico comparativo del carcinoma ovárico epitelial seroso, TUBA1A fue identificado como un predictor potencial de quimiorresistencia (Kim et al., 2011).

El gen TUBA1B codifica la tubulina, alfa 1b (RefSeq, 2002). La expresión diferencial de TUBA1B en combinación con la expresión de ciertos otros genes se asoció con el pronóstico en el linfoma de células del manto, la predicción de recidiva en los pacientes con cáncer colorrectal en estadio II y la distinción entre los melanomas de la úvea que

acabaron metastatizando y los que no lo hicieron (Blenk et al., 2008; Agesen et al., 2012; Linge et al., 2012). La expresión de TUBA1B apareció regulada al alza en tejidos de cáncer hepatocelular y en células en proliferación de ese mismo tipo de cáncer. El aumento de la expresión de TUBA1B estuvo asociado con una supervivencia global breve y con la resistencia al paclitaxel en pacientes con cáncer hepatocelular (Lu et al., 2013a). En células de cáncer de ovario, la expresión reducida de TUBA1B se asoció con la resistencia al oxaliplatino (Tummala et al., 2009).

El gen TUBA1C codifica la tubulina, alfa 1c (RefSeq, 2002). La expresión de TUBA1C se ha demostrado que está regulada al alza en el osteosarcoma y en el cáncer hepatocelular vinculado al HCV, y podría ser un biomarcador potencial de la oncogenia del osteosarcoma o del cáncer hepatocelular vinculado al HCV diferenciado (Kuramitsu et al., 2011; Li et al., 2010).

El gen TUBA3C codifica la tubulina, alfa 3c (RefSeq, 2002). El gen TUBA3D codifica la tubulina, alfa 3d (RefSeq, 2002). El gen TUBA4A codifica la tubulina, alfa 4a (RefSeq, 2002). El análisis proteómico comparativo del carcinoma epidermoide de esófago (ESCC) reveló el aumento de la expresión de TUBA4A (Qi et al., 2005).

El gen TUBA8 codifica la tubulina, alfa 8. Las mutaciones de TUBA8 están asociadas con la polimicrogiria y la hipoplasia del nervio óptico (RefSeq, 2002). En el hígado de ratón, TUBA8 resultó inducido tras el tratamiento con fenobarbital, una sustancia cancerígena no genotóxica. En estirpes celulares de carcinoma hepatocelular, la sobreexpresión de TUBA8 ha demostrado afectar al crecimiento, la proliferación y la migración celular (Kamino et al., 2011).

El gen UCN3 es un miembro de la familia de sauvagina/factor liberador de corticotropina/urotensina I. Está estructuralmente relacionado con el gen del factor liberador de corticotropina (CRF) y el producto codificado es un ligando endógeno de los receptores de tipo 2 del CRF. En el cerebro podría ser responsable de los efectos del estrés sobre el apetito (RefSeq, 2002). La Ucn3 es producida por las glándulas

suprarrenales normales y por los tumores suprarrenales (tanto los corticosuprarrenales como los feocromocitomas), y actúa como un regulador autocrino o paracrino en dichas glándulas, tanto normales como afectadas por un tumor (Takahashi et al., 2006). La urocortina 3 activa las vías de AMPK y AKT y potencia la disponibilidad de la glucosa en el músculo esquelético de rata (Roustit et al., 2014).

El gen VCAN es un miembro de la familia de los proteoglucanos agrecano/versicano. La proteína codificada es un gran proteoglucano de sulfato de condroitina que es uno de los componentes principales de la matriz extracelular. Esta proteína interviene en la adhesión, la proliferación y la migración celulares, así como en la angiogenia, y desempeña un papel central en la morfogénesis y el mantenimiento de los tejidos (RefSeq, 2002). La expresión de VCAN aparece regulada en fibroblastos asociados al cáncer a través de la señalización del receptor de tipo II del TGF-beta y de SMAD. El VCAN regulado al alza promovió la motilidad y la invasión de células de cáncer ovárico al activar la vía de señalización del NF-kappaB y de la regulación al alza de la expresión del CD44, la metaloproteinasa de matriz 9, y del receptor de motilidad mediado por el hialuronano (Yeung et al., 2013). Una firma genética de remodelación del colágeno que incluye la VCAN regulada por la señalización del TGF-beta está relacionada con la metástasis y la supervivencia breve en el cáncer de ovario seroso (Cheon et al., 2014). El VCAN aparece notablemente regulado al alza en el cáncer colorrectal en comparación con muestras apareadas de mucosa colónica sana y de tejidos tumorales procedentes de 53 pacientes (Pitule et al., 2013).

El gen WNT16, miembro 16 de la familia del punto de integración del MMTV de tipo áptero (*wingless*), codifica una proteína de señalización segregada que interviene en la oncogenia y en diversos procesos del desarrollo, incluida la regulación del destino de la célula y la especificación regional (*patterning*) durante la embriogenia (RefSeq, 2002). La expresión de WNT16 resultó estar regulada al alza en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) portadora de la translocación cromosómica t(1;19) y cumple una función importante en la leucemiogenia (Casagrande et al., 2006; Mazieres et al., 2005). Un estudio con estirpes celulares de LLA y muestras procedentes de pacientes con LLA demostró que

la regulación al alza del WNT16 y de un puñado de otros genes diana Wnt estaba causada por la metilación de los inhibidores del Wnt que a su vez estuvo vinculada con un descenso de la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global a 10 años vista (Roman-Gomez et al., 2007).

El gen WNT5A pertenece a la familia de genes WNT formada por genes relacionados estructuralmente que codifican proteínas de señalización segregadas. Estas proteínas han sido implicadas en la oncogenia y en varios procesos del desarrollo, como la regulación del destino de las células y la especificación regional durante la embriogenia. El gen WNT5A codifica un miembro de la familia WNT que envía señales a través tanto de vías del WNT canónicas como no canónicas. Esta proteína es un ligando del receptor transmembrana de siete pasos frizzled-5 y del receptor huérfano 2 de la tirosina cinasa. Cumple un cometido esencial en la regulación de vías del desarrollo durante la embriogenia. También podría estar implicada en la oncogenia (RefSeq, 2002). El WNT5A se sobreexpresa en el cáncer colorrectal y tiene una tasa de concordancia del 76% entre el tumor primario y el foco metastásico (Lee et al., 2014). WNT5A está regulado al alza y es un regulador clave de la transición epitelio-mesenquimática y la metástasis en las células del carcinoma gástrico humano, el carcinoma nasofaríngeo y el cáncer de páncreas (Kanzawa et al., 2013; Zhu et al., 2014; Bo et al., 2013).

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humores y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y de destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales

células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

En la presente memoria todos los términos corresponden a la definición indicada a continuación, salvo en los casos en que se indique otra cosa.

El término «respuesta de linfocitos T» define la proliferación y la activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. En el caso de los linfocitos T citotóxicos restringidos a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden consistir en la lisis de células diana presentadoras naturales de péptido o bien sensibilizadas de manera repetida con un péptido o con un precursor del mismo; la secreción de citocinas, preferiblemente de interferón gamma, TNF-alfa o IL-2 inducida por péptido; la secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptido; o la desgranulación.

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12, 13, 14 o más, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos de la invención) pueden tener hasta 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más aminoácidos de longitud.

Además, el término «péptido» incluye sales de una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente las sales son sales

farmacéuticamente aceptables de los péptidos, como por ejemplo, sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato). Se ha de destacar que las sales de los péptidos conformes a la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en tales condiciones *in vivo*.

El término «péptido» incluye también «oligopéptido». El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantenga el epítipo o epítipos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 15, aproximadamente.

El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantengan los epítipos adecuados. En contraste con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a las moléculas de más de unos 30 residuos de aminoácidos de longitud.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es «inmunogénico» (y, por lo tanto, un «inmunógeno» en la presente invención), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En el caso de la presente invención, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para desatar una respuesta por parte de los linfocitos T. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T. En otro aspecto, el inmunógeno puede ser el péptido, el complejo del péptido con MHC, el oligopéptido y/o la proteína que es utilizado para generar anticuerpos o TCR específicos contra él.

Un «epítipo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase

I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos.

En el ser humano hay tres locus genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y HLA-B*07 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos locus.

Tabla 5: Frecuencias de expresión F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y los serotipos más frecuentes del HLA-DR. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori et al., 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$. Las combinaciones de A*02 o A*24 con determinados alelos HLA-DR podrían ser más o menos abundantes de lo esperado a partir de sus frecuencias aisladas debido al desequilibrio de ligamiento. Para más detalles véase Chanock y cols. (Chanock et al., 2004)

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*02	Caucásica (América del Norte)	49,1%
A*02	Afroamericana (América del Norte)	34,1%
A*02	Asioamericana (América del Norte)	43,2%
A*02	Latinoamericana (América del Norte)	48,3%
DR1	Caucásica (América del Norte)	19,4%
DR2	Caucásica (América del Norte)	28,2%
DR3	Caucásica (América del Norte)	20,6%
DR4	Caucásica (América del Norte)	30,7%
DR5	Caucásica (América del Norte)	23,3%
DR6	Caucásica (América del Norte)	26,7%
DR7	Caucásica (América del Norte)	24,8%
DR8	Caucásica (América del Norte)	5,7%
DR9	Caucásica (América del Norte)	2,1%
DR1	Afroamericana (América del Norte)	13,20%
DR2	Afroamericana (América del Norte)	29,80%
DR3	Afroamericana (América del Norte)	24,80%
DR4	Afroamericana (América del Norte)	11,10%
DR5	Afroamericana (América del Norte)	31,10%
DR6	Afroamericana (América del Norte)	33,70%
DR7	Afroamericana (América del Norte)	19,20%
DR8	Afroamericana (América del Norte)	12,10%
DR9	Afroamericana (América del Norte)	5,80%
DR1	Asioamericana (América del Norte)	6,80%
DR2	Asioamericana (América del Norte)	33,80%
DR3	Asioamericana (América del Norte)	9,20%
DR4	Asioamericana (América del Norte)	28,60%
DR5	Asioamericana (América del Norte)	30,00%
DR6	Asioamericana (América del Norte)	25,10%
DR7	Asioamericana (América del Norte)	13,40%

DR8	Asioamericana (América del Norte)	12,70%
DR9	Asioamericana (América del Norte)	18,60%
DR1	Latinoamericana (América del Norte)	15,30%
DR2	Latinoamericana (América del Norte)	21,20%
DR3	Latinoamericana (América del Norte)	15,20%
DR4	Latinoamericana (América del Norte)	36,80%
DR5	Latinoamericana (América del Norte)	20,00%
DR6	Latinoamericana (América del Norte)	31,10%
DR7	Latinoamericana (América del Norte)	20,20%
DR8	Latinoamericana (América del Norte)	18,60%
DR9	Latinoamericana (América del Norte)	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. . UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	América del Sur	20%
A*24	Europa	18%

Los péptidos de la invención, preferiblemente cuando figuren incluidos en una vacuna de la invención tal y como se describe en la presente memoria se unirán a A*02. Una vacuna también podría incluir péptidos que se unan a cualquier MHC de clase II. Por consiguiente, la vacuna de la invención puede ser usada para tratar el cáncer en pacientes que sean A*02 positivos, mientras que la no selección para los alotipos de MHC de clase II es necesaria debido a la naturaleza panunionista de esos péptidos.

Combinar péptidos A*02 de la invención con péptidos que se unen a otro alelo como por ejemplo el A*24, tiene la ventaja de que se puede tratar a un porcentaje mayor de cualquier población de pacientes que si ésta solo se dirigiera contra un único alelo MHC de la clase I. Mientras que en la mayoría de poblaciones solo se podría tratar a menos del 50% si se optara por uno solo de los alelos, una vacuna que comprenda epítomos HLA-A*24 y HLA-A*02 de la invención permite tratar como mínimo al 60% de los pacientes de cualquier población relevante. En concreto, los porcentajes de pacientes positivos para al menos uno de tales alelos en diversas regiones son los siguientes: EE. UU. 61%, Europa occidental 62%, China 75%, Corea del Sur 77%, Japón 86% (calculados a partir de www.allelefrequencies.net).

En una forma de realización preferida, el término «secuencia nucleotídica» hace referencia a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

La secuencia nucleotídica que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido en particular puede ser natural o estar construida de forma sintética. Generalmente, los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas de la presente invención se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y de oligonucleótidos cortos de enlace, o a partir de una serie de oligonucleótidos, con el fin de proporcionar un gen sintético capaz de ser expresado en una unidad transcripcional recombinante que comprenda elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico.

Tal y como se utiliza en la presente memoria el término «un nucleótido que codifica un péptido» se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido y que incluye codones artificiales (sintetizados por el hombre) de inicio y terminación compatibles con el sistema biológico en el que la secuencia va a ser expresada por, por ejemplo, una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de TCR.

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye tanto el ácido nucleico monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, en lo que concierne por

ejemplo al ADN, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia.

El término «región codificante» hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión natural del gen.

La región codificante puede derivar de un gen no mutado («normal»), mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

El término «producto de expresión» define al polipéptido o a la proteína que es el producto natural de la traducción del gen y cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifiquen los equivalentes resultantes de la degeneración del código genético y, por tanto, que codifican el mismo aminoácido o aminoácidos.

El término «fragmento», cuando se refiere a una secuencia de codificación, define una porción de ADN que no comprende la región codificante entera, cuyo producto de expresión conserva esencialmente la misma actividad o función biológica que el producto de expresión de la región codificante entera.

El término «segmento de ADN» hace referencia a un polímero de ADN, en forma de un fragmento separado o como componente de un constructo de ADN mayor, que deriva de ADN aislado por lo menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, exento de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y de sus secuencias nucleotídicas constituyentes mediante métodos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma

de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes corriente abajo (*downstream*) desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

El término «cebador» define una secuencia corta de ácidos nucleicos que puede aparearse con una cadena de ADN y que proporciona un extremo 3'-OH libre en el que una polimerasa de ADN puede comenzar la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

El término «promotor» define una región de ADN implicada en la unión de la polimerasa de ARN para iniciar la transcripción.

El término «aislado» define el material que se extrae de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural, si ocurre de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero ese mismo polinucleótido o polipéptido lo estará si es separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Tales polinucleótidos podrán formar parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrán formar parte de una composición, y seguir estando aislados en dicho vector o composición puesto que estos no forman parte de su entorno natural.

Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunógenos, descritos de acuerdo con la presente invención también pueden presentarse en forma “purificada”. El término «purificado» no implica pureza absoluta; más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan sólo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de inicio o del material natural hasta,

al menos, un orden de magnitud; preferiblemente, dos o tres órdenes de magnitud; y, con mayor preferencia, cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos conforme a la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en “forma enriquecida”. Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada. El término «fragmento activo» define un fragmento, normalmente un péptido, polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos, que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunógena) cuando se administra –solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado o en un vector– a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán

porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Utilizados en relación con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje de identidad», al referirse a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces con la siguiente fórmula:

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

donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, donde

(I) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y

(II) cada hueco (*gap*) de la secuencia de referencia y

(III) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y

(IV) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas; y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la que la identidad porcentual, calculada como se ha especificado arriba, es aproximadamente igual o mayor que una identidad porcentual mínima especificada, entonces la secuencia comparada guarda la identidad porcentual mínima especificada con la secuencia de referencia, aunque puedan existir alineaciones en las que la entidad porcentual calculada arriba resulte menor que la identidad porcentual especificada.

Tal y como se ha dicho antes, la presente invención se refiere por tanto a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67 o una variante de las mismas que es un 88% homóloga a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, o una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido. Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o, en el caso de las versiones alargadas de dichos péptidos, a una molécula de la clase II.

En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas.

Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997)

Por «variante» de la secuencia de aminoácidos los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicadas en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de linfocitos T activados.

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía y de las bases de datos científicas (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión. Así pues, una persona versada en la técnica será capaz de modificar las secuencias de aminoácidos expuestos en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y será capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unión a moléculas MHC de clase I o II. Las variantes de la presente invención conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín definido en los aspectos de la invención.

Los péptidos originales (sin modificar) descritos aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Preferentemente tales sustituciones estarían situadas al final de la cadena de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, si un aminoácido es reemplazado por un aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrofóbico que es sustituido por otro aminoácido hidrofóbico. Aún más conservador sería el reemplazo de aminoácidos de tamaño y naturaleza química igual o similar como, por ejemplo, si una leucina se reemplaza por isoleucina. En diversos estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras, y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, siendo ésta la base para la definición de las «sustituciones conservadoras».

Las sustituciones conservadoras se definen en la presente invención como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).

Las sustituciones menos conservadoras pueden implicar el reemplazo de un aminoácido por otro con características similares pero diferenciado de alguna manera en el tamaño, como en el reemplazo de un residuo de isoleucina por alanina. Los reemplazos muy poco o nada conservadores pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por otro polar, o incluso por uno de carácter básico. Estas sustituciones «radicales» no se pueden descartar, sin embargo, como potencialmente inefectivas, ya que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales bien pueden provocar efectos inesperados imposibles de predecir de otra forma a partir de principios químicos simples.

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, se pueden usar también otros aminoácidos no convencionales (distintos de los aminoácidos naturales que constituyen las proteínas) con fines de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos acordes con la presente invención.

Si se descubre que las sustituciones en más de una posición resultan en un péptido con actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor, como se define más abajo, entonces las combinaciones de dichas sustituciones se probarán para determinar si las sustituciones combinadas provocan efectos aditivos o sinérgicos en la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirán hasta 4 posiciones simultáneamente dentro del péptido.

Un péptido consistente esencialmente en la secuencia de aminoácidos indicada puede tener intercambiados uno o dos aminoácidos que no formen parte del anclaje (véase más adelante el motivo de anclaje) sin que la capacidad de unión a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o clase II cambie sustancialmente o resulte negativamente afectada, en comparación con el péptido sin modificar. En otra forma de realización, un péptido consistente esencialmente en la secuencia de aminoácidos indicada en la presente memoria puede tener cambiados uno o dos aminoácidos por sus pares conservadores (véase más adelante) sin que la capacidad de unión a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o clase II cambie sustancialmente o resulte negativamente afectada, en comparación con el péptido sin modificar.

Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el receptor del linfocito T pueden ser modificados sustituyéndolos por otros aminoácidos cuya incorporación no afecte sustancialmente a la reactividad de los linfocitos T y no suprima la unión al MHC pertinente. Así pues, aparte de la condición indicada, el péptido de la invención puede ser cualquier péptido (en cuyo término los inventores incluyen oligopéptidos o polipéptidos), que incluya las secuencias de aminoácidos o una porción o una variante de las mismas tal y como se indican.

Tabla 6: Variantes y motivos de los péptidos acordes con las SEQ ID N.º 4, 29 y 30.

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 4	S	V	D	V	S	P	P	K	V
Variantes									I
									L
									A
		L							I
		L							L
		L							
		L							A
		A							I

		A							L
		A							
		A							A
		M							I
		M							L
		M							
		M							A
		T							I
		T							L
		T							
		T							A
		Q							I
		Q							L
		Q							
		Q							A
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 29	F	L	Q	E	Y	L	D	A	I
Variantes		I							L
		I							V
		I							
		I							A
		M							L
		M							V
		M							
		M							A
		A							L
		A							V
		A							
		A							A
		V							L
		V							V
		V							
		V							A
		T							L
		T							V
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							V

		Q							
		Q							A
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 30	V	V	D	E	G	P	T	G	V
Variantes									L
									I
									A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		L							L
		L							I
		L							
		L							A
		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A

También pueden ser adecuados péptidos más largos (alargados). También es posible que los epítomos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyan el epítomo real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítomo de interés sean residuos que no afecten sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epítomo durante el procesamiento.

Los péptidos de la invención se pueden alargar hasta cuatro aminoácidos, es decir, se pueden añadir 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en cualquier combinación entre 4:0 y 0:4. A continuación en la Tabla 7 se exponen combinaciones de las elongaciones conformes a la invención:

Tabla 7: Combinaciones de las elongaciones de los péptidos de la invención

C-terminal	N-terminal
4	0
3	0 o 1
2	0 o 1 o 2
1	0 o 1 o 2 o 3
0	0 o 1 o 2 o 3 o 4
N-terminal	C-terminal
4	0
3	0 o 1
2	0 o 1 o 2
1	0 o 1 o 2 o 3
0	0 o 1 o 2 o 3 o 4

Los aminoácidos para la elongación/extensión pueden ser los péptidos de la secuencia original de la proteína o cualquier otro aminoácido. La elongación tiene por finalidad mejorar la estabilidad o la solubilidad de los péptidos.

Así pues, los epítomos de la presente invención pueden ser idénticos a los epítomos específicos de tumor o asociados a tumor naturales o pueden incluir epítomos que difieran como máximo en cuatro residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.

En una forma de realización alternativa, el péptido se alarga por uno o ambos lados más de 4 aminoácidos, preferiblemente hasta una longitud total de hasta 30 aminoácidos. Esto puede dar como resultado péptidos que se unen a MHC de clase II. La unión a MHC de clase II se puede analizar con métodos conocidos en la materia.

En consecuencia, la presente invención también proporciona péptidos y variantes de epítomos de MHC de clase I en los que el péptido o variante tienen una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 14, esto es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos, que en el caso de los péptidos de unión de clase II también puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 aminoácidos.

Por supuesto, el péptido o variante conforme a la presente invención tendrá la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II. La unión de un péptido o una variante a un complejo MHC se puede analizar con métodos conocidos en la técnica.

Preferiblemente, cuando los linfocitos T específicos para un péptido acorde con la presente invención se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, preferiblemente como máximo de alrededor de 1 μ M, más preferiblemente como máximo de alrededor de 1 nM, y aún más preferentemente como máximo de alrededor de 100 pM, y más preferentemente como máximo de alrededor de 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por los linfocitos T de más de un individuo, de al menos dos, y más preferiblemente de tres individuos.

En una forma de realización preferida de la invención el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67.

«Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67 o una variante de las mismas, contiene segmentos adicionales de aminoácidos localizados en los extremos N- y/o C-terminal que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un epítipo para el epítipo de moléculas MHC.

No obstante, dichos segmentos pueden ser importantes para facilitar la introducción eficaz del péptido conforme a la presente invención en las células. En una forma de realización de la presente invención, el péptido es una parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "Ii") tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497. En otras fusiones, los péptidos de la presente invención se pueden fusionar con un anticuerpo tal y como se describe en la presente memoria, o con una parte funcional del mismo, en particular integrándolo en la secuencia del anticuerpo, para que vayan dirigidos específicamente por dicho anticuerpo, o por ejemplo, con un anticuerpo que es específico para las células dendríticas tal y como se describe en la presente memoria.

Además, el péptido o variante pueden ser modificados aún más para mejorar la estabilidad y/o la unión a las moléculas de MHC con el fin de desencadenar una respuesta inmunitaria más potente. Los métodos para conseguir esa optimización de una secuencia peptídica son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la introducción de enlaces peptídicos inversos o enlaces no peptídicos.

En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como por

ejemplo los descritos por Meziere y cols. (1997) (Meziere et al., 1997), y que se incorporan en la presente memoria como referencia. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (Meziere et al., 1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH=CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$ y $-\text{CH}_2\text{SO-}$. La patente de EE. UU. 4. 897. 445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos ($-\text{CH}_2\text{-NH}$) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH_3 .

Péptidos que comprenden las secuencias descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrofóbicos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej., el grupo hidrofóbico t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

Adicionalmente, los péptidos de la invención pueden ser sintetizados para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, puede utilizarse el D-isómero de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido en lugar del L-isómero habitual. Y aún más, al menos uno de los residuos de aminoácidos de los péptidos de la invención puede ser sustituido por uno de los consabidos residuos de aminoácidos no naturales. Alteraciones como éstas pueden servir para aumentar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la capacidad de unión de los péptidos de la invención.

De manera similar, un péptido o variante de la invención puede ser modificado químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CCR Press, 2004 (Lundblad, 2004), que se incorpora en la presente memoria como referencia. La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido perfórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

En resumen, la modificación de p. ej., los residuos arginilo de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilgloxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilgloxal con residuos de arginina. La cisteína se puede modificar sin la modificación simultánea de otros sitios nucleofílicos como sucede con la lisina y la histidina. Así pues, para la modificación de la cisteína hay disponible un gran número de reactivos. Las páginas web de empresas como Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) ofrecen información sobre reactivos concretos.

La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro. El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar

residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico. Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los residuos de lisina y otros grupos α -amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etilen)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas. Los residuos de metionina de las proteínas se pueden modificar, por ejemplo, con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.

Los residuos tirosilo se pueden modificar con tetranitrometano y N-acetilimidazol. La formación de enlaces cruzados por medio de la formación de ditirosina se puede consumir con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.

En estudios recientes sobre la modificación del triptófano se han empleado N-bromosuccinimida, 2-hidroxi-5-nitrobencilbromuro o 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol (BPNS-escatol).

La modificación de proteínas y péptidos terapéuticos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que la unión por entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos con fines de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamilación con cianato potásico.

Un péptido o variante que está modificado o que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contiene enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados p. ej., utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestra Lukas y cols. (Lukas et al., 1981) y las referencias que

aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxycarbonílicos (en el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonílicos (en el de la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores (*scavengers*) utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase, por ejemplo, (Bruckdorfer et al., 2004) y las referencias citadas en la misma).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores (*scavengers*) se

eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).

La purificación puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica o combinación de técnicas como la recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando p. ej., la separación con gradiente de acetonitrilo/agua.

El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía de capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

Para seleccionar los péptidos sobrepresentados se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación mediana de la muestra, así como la variación de los duplicados. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con muestras de tejido normal de referencia. Cada uno de esos perfiles se puede después consolidar en una puntuación de sobrepresentación calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (Pinheiro et al., 2015) ajustando para el análisis múltiple con la Tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*) (Benjamini and Hochberg, 1995).

Para la identificación y la cuantificación relativa de los ligandos HLA mediante espectrometría de masas se purificaron moléculas HLA de muestras de tejido criogenizadas y se aislaron los péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y se identificaron sus secuencias mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con ionización por nano-electronebulización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de

fragmentación de los TUMAP naturales registrados a partir de muestras de cáncer de páncreas (N = 18 muestras positivas para A*02) con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación natural de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de 18 pacientes con cáncer de páncreas.

La plataforma para el descubrimiento de fármacos patentada XPRESIDENT® v2. 1 (véase por ejemplo US 2013-0096016, que se incorpora íntegramente a la presente memoria) permite la identificación y la selección de candidatos a vacuna peptídica que están sobrepresentados en función de la cuantificación relativa de los niveles de péptidos restringidos a HLA en tejidos cancerosos respecto a diversos tejidos y órganos normales. Ello se consiguió mediante el desarrollo de la cuantificación diferencial sin marcador con los datos adquiridos de CL-EM procesados con una plataforma de análisis de datos patentada que combina algoritmos para la identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

Se calcularon los niveles de presentación incluyendo estimaciones de error para cada péptido y cada muestra. Se identificaron los péptidos presentados exclusivamente en tejido tumoral y los péptidos sobrepresentados en tejido tumoral respecto a los tejidos y órganos no cancerosos.

Se purificaron los complejos HLA-péptido presentes en muestras de tejido de cáncer de páncreas y se aislaron los péptidos asociados a HLA para después analizarlos con CL-EM (véanse ejemplos). Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de cáncer de páncreas primario para confirmar su presentación en el cáncer de páncreas primario.

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos tumorales de cáncer de páncreas y normales se cuantificaron con recuento iónico de los datos de CL-EM sin marcador. El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Todas las señales cuantitativas producidas por cada péptido en varios experimentos de CL-EM se normalizaron con medidas de tendencia central, se promediaron por muestra y se combinaron en un diagrama de barras, llamado perfil de presentación. El perfil de presentación combina diversos métodos de análisis como la búsqueda en bases de datos de proteínas, agrupación de espectros, deconvolución del estado de carga (descarga) y alineamiento del tiempo de retención y normalización.

La presente invención proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente del cáncer de páncreas, que sobrepresentan o presentan exclusivamente los péptidos de la invención. Con técnicas de espectrometría de masas se ha demostrado la presentación natural por moléculas HLA de estos péptidos en muestras humanas de cáncer de páncreas primario.

Se ha demostrado que el gen o genes/proteína o proteínas originarios (también denominadas «proteínas enteras» o «proteínas subyacentes») del cual derivan los péptidos aparecen notablemente sobreexpresados en los tejidos cancerosos con respecto a los tejidos normales –en la presente invención «tejidos normales» significa que son células pancreáticas sanas o células de otros tejidos normales– lo cual demuestra el alto grado de relación con el tumor de los genes originarios (véase ejemplo 2). Además, los péptidos en sí están fuertemente sobrepresentados en el tejido tumoral –en la presente invención se entiende por «tejido tumoral» una muestra extraída a un paciente aquejado de cáncer de páncreas, pero no de tejidos normales (véase el Ejemplo 1).

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T destruyen las células que presentan

el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej., células tumorales de páncreas que presentan los péptidos derivados.

Los péptidos de la presente invención han demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están sobrepresentados y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención (véanse el Ejemplo 3 y el Ejemplo 4). Asimismo, cuando los péptidos están formando un complejo con el MHC correspondiente pueden ser utilizados también para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención. Los métodos pertinentes son conocidos por los expertos y también se pueden hallar en la bibliografía pertinente. Así pues, los péptidos de la presente invención son útiles para generar en un paciente una respuesta inmunitaria con la que destruir células tumorales. La respuesta inmunitaria se puede inducir en el paciente con la administración directa de los péptidos descritos o de sustancias precursoras adecuadas (p. ej., péptidos alargados, proteínas o ácidos nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante). Cabe esperar que la respuesta inmunitaria generada por esa vacunación terapéutica sea muy específica contra las células tumorales porque los tejidos normales no contienen los péptidos diana de la presente invención en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

Una «composición farmacéutica» es una composición apta para la administración a un ser humano en un contexto médico. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es estéril y se fabrica conforme a las directrices de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base

libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo $-NH_2$ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej., ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

En una forma de realización especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma de sales de ácido acético (acetatos), trifluoroacetatos o ácido clorhídrico (cloruros).

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es un agente inmunoterapéutico como una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de forma i. d. , i. m. , s. c. , i. p. e i. v. , o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y (Longenecker et al., 1993)). El péptido también puede estar

marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a los linfocitos T CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de los linfocitos T CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, en el caso de los epítomos de MHC de clase I que estimulan a los linfocitos T CD8 la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítomos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo un polinucleótido) que codifica un péptido o variante peptídica de la invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos, monocatenarios y/o bicatenarios, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como por ejemplo, polinucleótidos con un esqueleto de fosforotioato y que pueden contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, sólo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido conforme a la invención.

Se han desarrollado diversos métodos para unir polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores, por ejemplo a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, al segmento de ADN se le pueden añadir prolongaciones de homopolímeros

complementarios para insertarlo en el vector de ADN. El vector y el segmento de ADN se unen a continuación por medio de puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Otro método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores son los ligadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción. Existen ligadores sintéticos comerciales que contienen diversas dianas para las endonucleasas de restricción que facilitan varios proveedores como International Biotechnologies Inc. New Haven, CT, EE. UU.

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen Saiki RK y cols. (Saiki et al., 1988)). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la invención puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las dadas a conocer en las patentes de EE. UU. N.º 4. 440. 859, 4. 530. 901, 4. 582. 800, 4. 677. 063, 4. 678. 751, 4. 704. 362, 4. 710. 463, 4. 757. 006, 4. 766. 075 y 4. 810. 648.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención se puede unir con una amplia variedad de secuencias de ADN distintas para introducirlo en un hospedador adecuado. El ADN

acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el ADN en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. En general, el vector no consigue transformar todos los hospedadores, lo que hará necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan quedado transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como por ejemplo de resistencia a antibióticos.

Otra alternativa consiste en incorporar el gen de ese rasgo seleccionable en otro vector con el que se cotransforma la célula hospedadora.

Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el ADN recombinante de la invención se cultivarán durante el tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que las personas versadas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas descritas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y, finalmente, ser recuperado.

Son muchos los sistemas de expresión conocidos, como bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, etc.), hongos filamentosos (género *Aspergillus*, etc.), células vegetales, animales o de insectos. Preferiblemente el sistema consistirá en células de mamífero, como las células CHO disponibles de la ATCC Cell Biology Collection.

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o el del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE. UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (YIp) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores dotados del promotor del CMV (por ejemplo de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable, expresión en el citoplasma o secreción, y marcaje de los extremos N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, c-myc o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, la purificación y el análisis de la proteína recombinante. Las fusiones con doble etiqueta aportan flexibilidad a la detección.

La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva de la proteína muy elevados, de hasta 1 mg/l en células COS. En estirpes celulares menos potentes los niveles de proteínas suelen rondar ~0,1 mg/l. La presencia del origen de replicación del SV40 genera niveles elevados de replicación del ADN en células COS que toleran la replicación del SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden contener el origen pMB1 (derivado del pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen de la b-lactamasa para la selección por resistencia a la ampicilina, hGH poliA, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la preprotripsina (PPT) pueden canalizar la secreción de las proteínas de fusión FLAG hacia el medio de cultivo, donde se pueden purificar por medio de anticuerpos anti-FLAG, resinas y placas. En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

En otra forma de realización dos o más péptidos o variantes peptídicas de la invención se codifican y se expresan en orden sucesivo (similar a constructos de «collar de

cuentas»). Al hacerlo, los péptidos o las variantes peptídicas se pueden enlazar o fusionar juntas mediante segmentos de aminoácidos enlazantes, como por ejemplo LLLLLL, o se pueden unir sin ningún otro péptido adicional entre ellos. Estos constructos también pueden ser utilizados para la terapia contra el cáncer, y podrían inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE. UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (N.º ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general pueden obtenerse de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas por ejemplo en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas versadas en la materia.

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen

del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véase por ejemplo Cohen y cols. (Cohen et al., 1972) and (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura descrita en Sherman y cols. (Sherman et al., 1986). El método de Beggs (Beggs, 1978) también es útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE. UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

Las células transformadas con éxito, es decir, las que contengan un constructo de ADN de la presente invención, se pueden identificar con técnicas bien conocidas como la PCR. Otra alternativa consiste en detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de anticuerpos.

Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la invención son útiles para la preparación de péptidos de la invención, por ejemplo las células bacterianas, de levadura e insecto. Con todo, para ciertos métodos terapéuticos pueden ser útiles otras células hospedadoras. Por ejemplo, se pueden utilizar células presentadoras de antígeno como las células dendríticas para expresar los péptidos de la invención de tal forma que puedan ser cargados en las moléculas MHC oportunas. Así pues, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la invención.

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE. UU. (FDA) el 29 de abril de 2010 para tratar el cáncer de próstata hormonorrefractario

metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de un péptido o de su variante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula o de su medio de cultivo.

En otra forma de realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante pueden ser preparados para la inyección por vía intravenosa (i. v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los métodos preferidos para la inyección del ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter et al., 2012).

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Una perspectiva general se puede consultar por ejemplo en Teufel y cols. (Teufel et al., 2005). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido

nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítipo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto tal y como se ha indicado antes.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej., respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T CD8-positivos y linfocitos T cooperadores (TH) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina o ligandos de TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. ej., MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Allison and Krummel, 1995). También se pueden usar citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej., el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej., GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. N.º 5.849.589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej., la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos TH1 y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, y se han obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). La patente de EE. UU. N.º 6. 406. 705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej., AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomida, temsirolimús, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmunitario (p. ej., anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, interferón-alfa, oligonucleótidos CpG y derivados, poli(I:C) y derivados, ARN, sildenafil, y formulaciones de partículas con PLG o virosomas.

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod, resiquimod e interferón-alfa.

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod y resiquimod. En otra forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es ciclofosfamida, imiquimod o resiquimod. Los adyuvantes más preferidos son: Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) y AcM anti-CD40 o combinaciones de los anteriores.

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, sabores, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, (Kibbe, 2000). La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2112253, por ejemplo.

Es importante tener presente que la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna conforme a la invención ataca el cáncer en diferentes estadios celulares y en diferentes estadios de desarrollo. Además, se atacan diferentes vías de señalización relacionadas con el cáncer. Esto supone una ventaja con respecto a las vacunas que solo van dirigidas contra una o pocas dianas, que pueden permitir que el tumor se adapte con facilidad al ataque (evasión tumoral). Además, no todos los tumores expresan el mismo patrón de antígenos, por lo que la combinación de varios péptidos asociados a tumor asegura que el tumor en cuestión contenga al menos alguna de las dianas. La composición ha sido diseñada de modo tal que se espera que exprese varios de los antígenos y abarque varias vías independientes necesarias para el crecimiento y el mantenimiento del tumor. Así pues, la vacuna puede ser utilizada con facilidad en la forma ya preparada (*off-the-shelf*) para una población de pacientes más amplia. Esto significa que no será preciso ninguna otra evaluación de biomarcadores de la expresión de los antígenos aparte del tipado del HLA para seleccionar a los pacientes que acabarán siendo tratados con la vacuna, pero que, aun así, está asegurado que la respuesta inmunitaria estimulada atacará simultáneamente a varias dianas, lo que es importante para la eficacia (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Tal y como se emplea en la presente memoria, el término «soporte» se refiere a una molécula que se une específicamente a un determinante (p. ej., antigénico). En una forma de realización, un soporte es capaz de dirigir la entidad a la que se ha unido (p. . ej. , una (segunda) porción unida a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral o de estroma tumoral portador del determinante antigénico (p. ej., el complejo de un péptido conforme a la presente solicitud). En otra forma de realización un soporte es capaz de activar la señalización mediante su antígeno diana, por ejemplo un antígeno del complejo del receptor del linfocito T. Los soportes incluyen, entre otros, anticuerpos y fragmentos de los mismos, los dominios de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprenden una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y otra región variable de la cadena ligera del anticuerpo, proteínas de unión que comprenden al menos un motivo repetido de anquirina y moléculas con un solo dominio de unión a antígeno (SDAB), aptámeros, TCR (solubles) y células (modificadas) como linfocitos T alogénos o autólogos. Para evaluar si una molécula es un soporte que se une a una diana, se pueden efectuar ensayos de unión.

Unión «específica» significa que el soporte se une al complejo péptido-MHC de interés mejor que a otros complejos de péptido-MHC naturales, hasta el punto de que un soporte dotado de una molécula activa que es capaz de matar una célula portadora de la diana específica no puede matar otra célula que carezca de esa diana específica aunque presente otro u otros complejos péptido-MHC. La unión a otros complejos péptido-MHC es irrelevante si el péptido del complejo péptido-MHC que reacciona de forma cruzada no es natural, es decir, no deriva del peptidoma-HLA humano. Las pruebas para evaluar la destrucción de las células diana son bien conocidas en la técnica. Deben realizarse con células diana (células primarias o estirpes celulares) con una presentación intacta de péptido-MHC, o células cargadas con péptidos de tal modo que se alcancen los niveles de péptido-MHC naturales.

Cada soporte puede comprender un marcador que permita detectarlo una vez unido mediante la determinación de la presencia o la ausencia de una señal generada por dicho

marcador. Por ejemplo, el soporte puede ser marcado con un colorante fluorescente o cualquier otra molécula marcadora celular adecuada. Tales moléculas marcadoras son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo en el caso del marcaje por fluorescencia, como el facilitado por un colorante fluorescente, la visualización del aptámero unido se puede lograr mediante microscopía de fluorescencia o de barrido láser o por citometría de flujo.

Cada soporte se puede conjugar con una segunda molécula activa, como por ejemplo IL-21, anti-CD3 y anti-CD28.

Para más información sobre los soportes polipeptídicos véase por ejemplo el apartado de información general de WO2014/071978A1 y las referencias citadas en la misma.

La presente invención se refiere, además, a aptámeros. Los aptámeros (véase por ejemplo WO 2014/191359 y la bibliografía citada en ella) son moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios cortas, que se pueden plegar hasta adoptar estructuras tridimensionales definidas y que reconocen estructuras diana específicas. Parecen ser alternativas adecuadas para el desarrollo de terapias dirigidas. Los aptámeros han demostrado su unión selectiva a una gama de dianas complejas con elevada afinidad y especificidad.

En la pasada década han sido descubiertos aptámeros que reconocen moléculas situadas en la superficie celular que constituyen un medio para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas. La toxicidad y la inmunogenicidad de los aptámeros es, hasta donde se sabe, prácticamente nula, por lo que son candidatos prometedores a aplicaciones biomédicas. Y son aptámeros, por ejemplo aptámeros que reconocen el antígeno de membrana específico de la próstata, los que han sido empleados con éxito en terapias dirigidas y han demostrado su funcionalidad en modelos de xenoinjerto *in vivo*. Además, se han descubierto aptámeros que reconocen estirpes de células tumorales específicas.

Es posible seleccionar aptámeros de ADN para desvelar propiedades de reconocimiento de amplio espectro contra varias células cancerosas, y particularmente las derivadas de tumores sólidos, en tanto que las células sanas primarias y no oncogénicas no son reconocidas. Si los aptámeros descubiertos reconocieran no solo un subtipo de tumor concreto sino que interaccionaran con una serie de tumores, se convertirían en una herramienta aplicable para el diagnóstico y la terapéutica de amplio espectro.

Además, las investigaciones de su unión a células mediante la citometría de flujo ha demostrado que los aptámeros presentan una excelente afinidad aparente en la escala nanomolar.

Los aptámeros resultan útiles para fines diagnósticos y terapéuticos. Además, ha sido posible demostrar que algunos aptámeros son captados por las células tumorales y pueden actuar, así como vehículos moleculares para la administración dirigida de agentes antineoplásicos como ARNsi en las células tumorales.

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º7, conforme con la presente invención con la molécula MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

Los péptidos de la presente invención pueden usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden ser utilizados como terapia, dirigiendo toxinas o sustancias radiactivas contra el tejido enfermo. Otra aplicación de estos anticuerpos consistiría en dirigir radionúclidos contra el tejido enfermo en aplicaciones de diagnóstico por la imagen como la TEP. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o determinar el tamaño y la ubicación precisa de los tejidos enfermos.

Por tanto, existe otro aspecto de la invención que proporciona un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: inmunizar un mamífero no humano genéticamente modificado que comprenda células que expresen dicho complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II con una forma soluble de una molécula MHC de clase I o II unida a dicho antígeno restringido a HLA; aislamiento de moléculas de ARNm a partir de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; producción de una fagoteca que contenga moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislamiento de al menos un fago de dicha fagoteca, en que al menos ese fago contenga dicho anticuerpo que se une específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II unido con dicho antígeno restringido a HLA.

Existe otro aspecto más de la invención que proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, en el que el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo quimérico.

En WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en publicaciones (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003) se dan a conocer métodos para producir tales anticuerpos y complejos mayores de histocompatibilidad de clase I monocatenarios, así como otras herramientas para la producción de tales anticuerpos, que a efectos de la presente invención se incorporan todos de forma explícita en su integridad.

Preferiblemente el anticuerpo se une al complejo con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar, preferentemente inferior a 10 nanomolar, lo cual se considera «específico» en el contexto de la presente invención.

La presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, o a una variante de las mismas que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67 o una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, en que dicho péptido no es un polipéptido entero subyacente.

La presente invención se refiere, además, a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67 o a una variante de las mismas que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, en que dicho péptido o variante tiene una longitud total de 8 a 100, preferiblemente de 8 a 30, y más preferiblemente de 8 a 14 aminoácidos.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos acordes con la presente invención que tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) de clase I o II.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos acordes con la presente invención en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conforme a la presente invención, en que dichos péptidos están modificados (químicamente) y/o incluyen enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conformes a la presente invención, en que dichos péptidos son parte de una proteína de fusión, en particular comprenden aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii), o en que el péptido está fusionado con (o en la secuencia de) un anticuerpo, como por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos acordes con la presente invención, siempre que el péptido no sea la proteína humana completa (entera).

La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico acorde con la presente invención que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico conforme a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la presente invención para el uso en medicina, en concreto para el tratamiento del cáncer de páncreas.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la invención.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora acorde con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente una célula dendrítica.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir un péptido acorde con la presente invención, que comprende el cultivo de la célula hospedadora acorde con la presente invención y el aislamiento del péptido de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención en que el antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la

superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad de antígeno suficiente con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos conforme a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos conformes a la presente invención, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T conforme a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al uso como medicamento o en el proceso de fabricación de un medicamento de cualquiera de los péptidos descritos, de un ácido nucleico conforme a la presente invención, de un vector de expresión conforme a la presente invención, de una célula conforme a la presente invención, o de un linfocito T citotóxico activado conforme a la presente invención. La presente invención se refiere, además, a un uso conforme a la presente invención en el que el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente invención se refiere, además, a un uso conforme a la presente invención en el que dicho medicamento es una vacuna. La presente invención se refiere, además, a un uso conforme a la invención en el que el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente invención se refiere, además, al uso conforme con la invención, en que dichas células tumorales son células de cáncer de páncreas u otras células de tumores sólidos o hematológicos como cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de colon o recto, o leucemia.

La presente invención se refiere, además, a proteínas marcadoras y biomarcadores concretos basados en los péptidos acordes con la presente invención, aquí denominados «dianas» que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer de páncreas. Además, la presente invención se refiere al uso de estas nuevas dianas para el tratamiento del cáncer.

El término «anticuerpo» o «anticuerpos» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas o «enteras», el término «anticuerpos» también incluye los fragmentos (p. ej., fragmentos CDRs, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las mismas, siempre que exhiban alguna de las propiedades deseadas (p. ej., unión específica de un polipéptido marcador del cáncer de páncreas, liberación de una toxina en una célula de cáncer de páncreas que exprese un gen marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del cáncer de páncreas) conforme a la invención.

Si es posible los anticuerpos de la invención se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entiende que para fabricar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto polipéptidos marcadores de cáncer de páncreas enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la invención se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural o se puede producir con técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un ADNc que codifique un péptido acorde con la presente invención, como un péptido acorde con el polipéptido de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, o una variante

o fragmento de las mismas, se puede expresar en células procariotas (p. ej., bacterias) o eucariotas (p. ej., células de levadura, insecto o mamífero), a partir de las cuales se purificará la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador del cáncer de páncreas utilizado para generar el anticuerpo conforme a la invención.

Una persona versada en la técnica sabrá que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo dotado de la especificidad y la afinidad necesarias para el uso previsto (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, técnicas de imagen *in vivo*, tratamiento con inmunotoxinas). Los anticuerpos son analizados para buscar la actividad deseada con métodos conocidos, de acuerdo con el fin previsto para los anticuerpos (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc. ; para más detalles sobre la generación y el análisis de anticuerpos, véase por ejemplo, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con pruebas ELISA, inmunotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.

El término «anticuerpo monoclonal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población notablemente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posiblemente naturales que pueden estar presentes en pequeño número. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales

anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (N.º pat. de EE. UU. 4. 816. 567, que se incorpora a la presente memoria íntegramente).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que estimula a los linfocitos para que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Otra alternativa consiste en inmunizar los linfocitos *in vitro*.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE. UU. N.º 4. 816. 567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (p. ej., con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

Los métodos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo con técnicas ordinarias conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Ejemplos de la digestión con papaína aparecen descritos en WO 94/29348 y en la Pat. de EE. UU. N.º 4. 342. 566. La digestión de anticuerpos con papaína normalmente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno dotado de un sitio de unión al antígeno, así como un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento F(ab')₂ y otro fragmento pFc'.

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna

propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la biolongsitud, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagenia de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagenia dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., de ratón) son formas quiméricas de inmunoglobulinas, de cadenas de inmunoglobulina o de fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab' u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una pequeña secuencia derivada de inmunoglobulinas no humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que está dotada de la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales (FR) del fragmento Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no están presentes ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en las secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá prácticamente la totalidad de al menos uno, y normalmente de dos dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponderán a las de la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios residuos de aminoácidos de origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son denominados residuos «importados», que normalmente se extraen del dominio variable «importado». La humanización se puede llevar a cabo básicamente sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (Pat. de EE. UU. N.º 4. 816. 567), en los que una parte notablemente más pequeña que un dominio variable humano intacto ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

Se pueden emplear animales transgénicos (p. ej., ratones) que tras la inmunización sean capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin producir inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes germinales provoca la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. También se pueden producir anticuerpos humanos en fagotecas.

Los anticuerpos de la invención se administran preferiblemente a un sujeto incorporándolos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente a la formulación se le añade una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución esté situado aproximadamente entre 5 y 8, y más preferiblemente entre 7 y 7,5 aproximadamente. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación prolongada

como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, p. ej., películas, liposomas o micropartículas. Para las personas versadas en la técnica será evidente que son preferibles ciertos vehículos dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se va a administrar.

Los anticuerpos se pueden administrar al sujeto, al paciente o a las células mediante inyección (intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, etc.), o con otros métodos como la infusión que aseguren su liberación efectiva en el torrente sanguíneo. Los anticuerpos también se pueden administrar por vía intratumoral o peritumoral para ejercer un efecto terapéutico a la par sistémico y local. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosis y pautas de administración más adecuadas se pueden determinar empíricamente; la toma de decisiones a este respecto forma parte de los conocimientos de la materia. Las personas versadas en la materia saben que la dosis de anticuerpos a administrar depende, por ejemplo, del sujeto que va a recibir al anticuerpo, la vía de administración, el tipo concreto de anticuerpo y de otros medicamentos que se le estén administrando. La dosis diaria típica de anticuerpo cuando se utiliza solo puede oscilar entre 1 $\mu\text{g/kg}$ y 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los susodichos factores. Tras la administración del anticuerpo, preferiblemente para el tratamiento contra el cáncer de páncreas, la eficacia del anticuerpo terapéutico se puede evaluar de varios modos bien conocidos por el médico especialista. Por ejemplo se puede controlar el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer en el sujeto receptor del tratamiento utilizando técnicas de imagen oncológicas estándar. Todo anticuerpo administrado con fines terapéuticos que detenga el crecimiento del tumor, reduzca su extensión y/o impida la aparición de nuevos tumores en contraste con la evolución de la enfermedad si no se produjera la administración del anticuerpo, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un receptor de linfocito T soluble (sTCR) que reconoce un complejo de péptido-MHC específico. Dichos receptores de linfocitos T solubles se pueden generar a partir de clones de linfocitos T específicos, cuya afinidad se puede incrementar por mutagenia dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). A fin de estabilizar los receptores de linfocito T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar por ejemplo mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191) y dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia a un receptor. Se puede encontrar más información en WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. Se describe una combinación de sTCR en WO 2012/056407A1. Otros métodos de producción se revelan en WO 2013/057586A1.

Además, los péptidos y/o los TCR o anticuerpos u otras moléculas de unión de la presente invención se pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

Los anticuerpos o TCR también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (K_d) es inferior a $1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Los anticuerpos para uso diagnóstico pueden ser marcados con sondas adecuadas para posibilitar la detección con diferentes métodos ópticos. Los métodos para la detección

de sondas incluyen, entre otros, microscopía de fluorescencia, óptica, confocal y electrónica; resonancia magnética y espectroscopía; radioscopia, tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, entre otras, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Los anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La fijación de sondas a los anticuerpos incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda en el anticuerpo, y la unión covalente de un compuesto quelante para unir la sonda, entre otros métodos consabidos en la técnica. Para las técnicas de inmunohistoquímica, la muestra de tejido patológico puede ser fresca o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante como formol. El corte fijado o incluido que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, de modo que el anticuerpo se emplea para detectar la expresión *in situ* de las proteínas.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo dicho método la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de linfocitos T con moléculas MHC humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada por tiempo suficiente para activar los linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo el antígeno un péptido conforme a la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

Preferiblemente, la célula de mamífero carece del transportador de péptidos TAP o bien este se presenta en un nivel reducido o funciona defectuosamente. Las células adecuadas que carecen del transportador de péptidos TAP incluyen las células T2, RMA-S y de *Drosophila*. TAP es el transportador relacionado con el procesamiento de los antígenos.

La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE. UU. con el N.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila* Schneider line 2 está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Ljunggren y cols. (Ljunggren and Karre, 1985).

Preferentemente, la célula hospedadora no expresa sustancialmente moléculas MHC de clase I antes de la transfección. También es preferible que la célula estimuladora exprese una molécula importante que proporcione una señal coestimuladora para los linfocitos T, como B7. 1, B7. 2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase I y de las moléculas co-estimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

Si se utiliza como antígeno un epítipo de MHC de clase I, los linfocitos T serán linfocitos T CD8-positivos.

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 67, o una secuencia de aminoácidos variante de las mismas.

Existen otros métodos para generar linfocitos T *in vitro*. Por ejemplo, emplear linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski y cols. (Plebanski et al., 1995) recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de los linfocitos T. Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter y cols. (Walter et al., 2003) describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es

otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En la presente invención, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite el desencadenamiento de respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidez alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad co-estimuladora como anticuerpos anti-CD28. Tales sistemas de aAPC también precisan a menudo el concurso de factores solubles adecuados, por ejemplo citocinas, como la interleucina-12.

Para la preparación de linfocitos T también se pueden utilizar células alogénicas; en WO 97/26328 se describe detalladamente un método que se incorpora a la presente memoria como referencia. Por ejemplo, además de células de *Drosophila* y de células T2, para presentar antígenos se pueden usar otras células tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras y células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo se pueden utilizar virus vegetales (véase por ejemplo Porta y cols. (Porta et al., 1994), que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).

Los linfocitos T activados que están dirigidos contra los péptidos de la invención son útiles como tratamiento. Así pues, otro aspecto de la invención proporciona linfocitos T activados obtenibles por los susodichos métodos de la invención.

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 67.

Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interaccionando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo uniéndosele. Los linfocitos T son útiles en un

método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención y al cual se le administre un número eficaz de linfocitos T activados. Los linfocitos T que se le administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser linfocitos T autólogos. Otra alternativa consiste en que los linfocitos T no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que dicho individuo esté sano. Por «individuo sano» los inventores entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que pueda detectarse mediante análisis.

En condiciones *in vivo*, las células diana de los linfocitos T CD8-positivos conformes a la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase II) y/o células estromales circundantes al tumor (células tumorales) (que en ocasiones también expresan MHC de clase II; (Dengjel et al., 2006)).

Los linfocitos T de la presente invención se pueden usar como principios activos de una composición terapéutica. Por tanto, la invención también proporciona un método para destruir células diana de un paciente que expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, comprendiendo dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los definidos arriba.

Por «expresado de forma aberrante» los inventores también quieren decir que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen está reprimido en el tejido del que deriva el tumor pero en cambio se expresa en éste. Por «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el nivel del polipéptido es como mínimo 1,2 veces mayor que el nivel en el tejido normal; preferiblemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferiblemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que el del tejido normal.

Los linfocitos T se pueden obtener por métodos conocidos en la materia, como, por ejemplo, los antes descritos.

Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos. Se pueden encontrar revisiones en: Gattioni y cols. y en Morgan y cols. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de los péptidos formando un complejo con MHC para generar un receptor de linfocito T cuyo ácido nucleico se clona y se introduce en una célula hospedadora, preferiblemente un linfocito T. Ese linfocito T modificado se puede entonces transferir a un paciente como tratamiento contra el cáncer.

Cualquier molécula de la invención, ya sea péptido, ácido nucleico, anticuerpo, vector de expresión, célula, linfocito T activado, receptor de linfocito T o el ácido nucleico que lo codifique es útil para el tratamiento de trastornos caracterizados por células que eluden la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, cualquier molécula de la presente invención puede ser utilizada como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede ser utilizada sola o combinada con otra molécula o moléculas de la invención o con cualquier o cualesquier moléculas conocidas.

La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular del cáncer de páncreas y de otras neoplasias malignas.

La presente invención también contempla un equipo que comprende:

- (a) un envase con una composición farmacéutica como la descrita más arriba, en forma de solución o liofilizada;
- (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y
- (c) opcionalmente, (I) instrucciones de uso de la solución o (II) de la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

El equipo puede comprender, además, uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (V) una jeringa. El envase es preferiblemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

Los equipos de la presente invención comprenden, preferiblemente, una formulación liofilizada de la presente invención en un envase adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p. ej., viales con doble cámara), jeringas (como jeringas con doble cámara) y tubos de ensayo. El envase puede estar formado por materiales diversos como vidrio o plástico. Preferiblemente el kit y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

El envase que contiene la formulación puede ser un vial multiuso que permita varias administraciones (p. ej., de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El equipo puede comprender, además, un segundo envase que contenga un diluyente adecuado (p. ej., una solución de bicarbonato sódico).

Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituida es preferiblemente como mínimo de 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferiblemente como máximo de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El equipo puede incluir, además, otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Los equipos de la presente invención pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención, acompañado o no de otros componentes (p. ej., otros compuestos o composiciones

farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.

Preferiblemente, los equipos de la invención incluyen una formulación de la invención acondicionada para ser utilizada y administrada conjuntamente con un segundo compuesto (como adyuvantes (p. ej., GM-CSF), un agente de quimioterapia, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o agente anti-angiogénesis, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente. Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

El envase de un equipo terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Si hay más de un componente, normalmente el equipo contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el equipo terapéutico contendrá un aparato (p. ej., una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.) para permitir la administración de los agentes de la invención que son componentes del presente equipo.

La presente formulación puede ser toda aquella que sea adecuada para la administración de los péptidos a través de cualquier vía aceptable como la oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Se prefiere la administración subcutánea y, con mayor preferencia, la intradérmica tal vez a través de una bomba de infusión.

Puesto que los péptidos de la invención proceden de tejido tumoral relacionado con el cáncer de páncreas, el medicamento de la invención se utiliza preferentemente para tratar el cáncer de páncreas.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir un producto farmacéutico personalizado para un paciente concreto, que comprende la fabricación de una composición farmacéutica que consta como mínimo de un péptido escogido de un archivo (base de datos) de TUMAP preseleccionados, en la que por lo menos un péptido de la composición farmacéutica es seleccionado por su idoneidad para ese paciente. En una forma de realización, la composición farmacéutica es una vacuna. El método también se puede adaptar para producir clones de linfocitos T para aplicaciones destinadas a la obtención del producto acabado, como son el aislamiento de TCR, o de anticuerpos solubles y otras opciones de tratamiento.

Un «producto farmacéutico personalizado» significa concretamente terapias personalizadas para un paciente que solo serán utilizadas para tratarlo a él, tales como vacunas contra el cáncer personalizadas y terapias celulares adoptivas con tejido autólogo del paciente.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «archivo» (*warehouse*) designa un grupo de péptidos que han sido preseleccionados por su inmunogenicidad y/o sobrerepresentación en un tipo concreto de tumor. El término «archivo» no implica que los péptidos concretos incluidos en la vacuna hayan sido prefabricados y almacenados en un lugar físico, aunque contempla esa posibilidad. Se contempla expresamente que los péptidos puedan ser fabricados *de novo* para cada vacuna individualizada producida, o que puedan ser prefabricados y guardados. El archivo (p. ej., en forma de una base de datos) está compuesto por péptidos asociados a tumor que se sobreexpresan fuertemente en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de páncreas que presentan varios alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C. Puede contener péptidos de MHC de clase I y de clase II o péptidos alargados de MHC de clase I. Además de los péptidos asociados a tumor obtenidos de varios tejidos de cáncer de páncreas, el archivo puede contener

péptidos marcadores HLA-A*02 y HLA-A*24. Estos péptidos permiten comparar cuantitativamente la magnitud de la inmunidad dependiente de los linfocitos T inducida por los TUMAP y, por consiguiente, extraer importantes conclusiones sobre la capacidad de la vacuna para desencadenar respuestas antitumorales. En segundo lugar, actúan como importantes péptidos de control positivo procedentes de un antígeno exógeno en el supuesto de que no se observe ninguna respuesta de linfocitos T inducida por la vacuna contra los TUMAP derivados de autoantígenos del paciente. Y tercero, a veces permite extraer conclusiones en cuanto al estado de inmunocompetencia del paciente.

Los TUMAP del archivo se identifican por medio de una estrategia que combina la genómica funcional integrada con el análisis de la expresión génica, la espectrometría de masas y la inmunología de linfocitos T (XPresident®). La estrategia asegura que solo los TUMAP realmente presentes en un alto porcentaje de tumores sean escogidos para proseguir el análisis, descartando los que no se expresan o lo hacen muy poco en el tejido normal. Para la selección del péptido inicial, se analizaron de forma escalonada muestras de cáncer de páncreas de pacientes y de sangre extraída a donantes sanos:

1. Se identificaron con espectrometría de masas los ligandos HLA del material canceroso.
2. Se procedió a realizar un análisis hologenómico de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para descubrir los genes que se sobreexpresaban en el tejido maligno (cáncer de páncreas) en comparación con una gama de órganos y tejidos normales.
3. Los ligandos HLA identificados se compararon con los datos de expresión génica. Los péptidos sobreexpresados o expresados selectivamente por el tejido tumoral, preferiblemente los codificados por genes sobreexpresados o expresados selectivamente como los detectados en el segundo paso se consideraron TUMAP candidatos para la vacuna multipeptídica.

4. Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica para hallar datos adicionales que avalaran la relevancia de los péptidos identificados como TUMAP.

5. La relevancia de la sobreexpresión al nivel del ARNm se confirmó volviendo a detectar en el tejido tumoral los TUMAP seleccionados en el paso 3 y comprobando que no se detectaban (o lo eran muy poco) en los tejidos sanos

6. Para evaluar si era factible que los péptidos seleccionados indujeran respuestas de linfocitos T *in vivo*, se llevaron a cabo pruebas de inmunogenicidad *in vitro* con linfocitos T humanos de donantes sanos y de pacientes con cáncer de páncreas.

En otro aspecto, los péptidos son preseleccionados por su inmunogenicidad antes de ser incluidos en el archivo. A modo de ejemplo y sin ánimo de limitación, la inmunogenicidad de los péptidos incluidos en el archivo se determina con un método que comprende la estimulación reiterada *in vitro* de linfocitos T CD8+ de donantes sanos con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con los complejos de péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28.

Este método es preferido para cánceres raros y pacientes con un perfil de expresión inusual. En contraste con los cócteles multiptéptidos de composición fija que se están desarrollando el archivo permite una concordancia significativamente mayor de la expresión real de antígenos en el tumor con la vacuna. Se puede usar un péptido o combinaciones de varios péptidos «*off-the-shelf*» para cada paciente como parte de una estrategia multidisciplinaria. En teoría una estrategia basada en la selección de, pongamos, 5 péptidos antigénicos distintos de una librería de 50 generaría unos 17 millones de composiciones farmacéuticas posibles.

En un aspecto, los péptidos son seleccionados para la inclusión en la vacuna en función de su idoneidad para cada paciente según un método acorde con la presente invención, tal y como se expone en la presente memoria y a continuación.

Se recopilan los datos del fenotipo del HLA, transcriptómicos y peptidómicos del material tumoral y de muestras de sangre del paciente para identificar los péptidos más adecuados que contengan TUMAP contenidos en el «archivo» y exclusivos del paciente (es decir, mutados). Se escogerán los péptidos que se expresen de forma selectiva o que se sobreexpresen en el tumor del paciente y, si es posible, que presenten una potente inmunogenicidad *in vitro* si se prueban con los PBMC del paciente.

Preferentemente, los péptidos incluidos en la vacuna se identificarán con el método consistente en: (a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión; (b) comparación de los péptidos identificados con (a) un archivo (base de datos) de péptidos como el descrito antes; y (c) selección de al menos un péptido de la base de datos que presente correlación con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente. Por ejemplo, los TUMAP presentados por la muestra del tumor se identifican mediante: (a1) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal del mismo tipo de tejido de 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 secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Preferentemente, 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. Preferentemente, la muestra tumoral y el tejido normal se obtienen del mismo paciente.

Además de, o como alternativa a, la selección de péptidos con el modelo del archivo (base de datos), los TUMAP también se pueden identificar en el paciente *de novo* e incluirse después en la vacuna. A modo de ejemplo, los TUMAP candidatos se pueden identificar en el paciente mediante (a) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal que corresponde al tipo de tejido de la muestra del tumor para identificar proteínas que se

sobreexpresan o se expresan de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Como otro ejemplo, se pueden identificar proteínas portadoras de mutaciones que sean exclusivas de la muestra tumoral en comparación con el correspondiente tejido normal del paciente, así como encontrar TUMAP que permitan reconocer específicamente la mutación. Por ejemplo, el genoma del tumor y el del tejido normal correspondiente se pueden secuenciar mediante secuenciación hologenómica: Para descubrir mutaciones que no sean sinónimas en las regiones codificadoras de las proteínas de los genes, se extraen el ADN y el ARN genómicos de tejidos tumorales y el ADN genómico germinal normal y no mutado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La estrategia de secuenciación de nueva generación (NGS) aplicada queda limitada a la re-secuenciación de las regiones codificantes de proteínas (re-secuenciación del exoma). Con este objeto, se captura el ADN exónico de muestras humanas con equipos de enriquecimiento dirigido suministrados por el proveedor y se procede a la secuenciación con p. ej., un secuenciador HiSeq2000 (Illumina). Además, se secuencia el ARNm del tumor para determinar la cuantificación directa de la expresión génica y la validación de que los genes mutados se expresan en los tumores del paciente. Los millones de lecturas de secuencia resultantes se procesan con algoritmos informáticos. La lista de resultados contiene mutaciones y la expresión génica. Las mutaciones somáticas específicas del tumor se determinan comparándolas con las variaciones germinales derivadas de las PBMC y se priorizan. Los péptidos identificados *de novo* pueden ser analizados para determinar su inmunogenicidad según lo descrito antes con el archivo, y los TUMAP candidatos que posean la inmunogenicidad adecuada se escogen para la inclusión en la vacuna.

En una forma de realización indicada a título de ejemplo, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante: (a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión mediante el método antes descrito; (b) comparación de los péptidos identificados en a) el archivo (base de

datos) de péptidos que han sido preseleccionados por su inmunogenicidad y su sobrerepresentación en tumores respecto al correspondiente tejido normal; (c) selección de al menos un péptido de la base de datos que presente correlación con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente; y (d) opcionalmente, selección de al menos un péptido identificado *de novo* en el paso (a) para confirmar su inmunogenicidad.

En una forma de realización indicada a título de ejemplo, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante: (a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión; y (b) opcionalmente, selección de al menos un péptido identificado *de novo* en el paso (a) para confirmar su inmunogenicidad.

Una vez escogidos los péptidos para la vacuna basada en péptidos personalizados, se fabrica la vacuna. La vacuna preferiblemente es una formulación líquida consistente en los péptidos individuales disueltos en DMSO entre el 20% y el 40%, preferiblemente en DMSO entre el 30% y el 35%, como aproximadamente DMSO al 33%.

Cada péptido se disuelve en DMSO antes de formar parte del producto. La concentración de cada solución de péptido se escoge dependiendo del número de péptidos que formarán parte del producto. Cada solución de péptido y DMSO se mezcla en partes iguales para obtener una solución que contenga todos los péptidos del producto con una concentración de ~2,5 mg/ml por péptido. La solución mezclada se diluye a 1:3 con agua para inyectables hasta alcanzar una concentración de 0,826 mg/ml por péptido en DMSO al 33%. La solución diluida se filtra con un filtro estéril de 0,22 µm. Se obtiene la solución final a granel.

La solución final a granel se envasa en viales y se conserva a -20 °C hasta su uso. Un vial contiene 700 µl de solución que contiene 0,578 mg de cada péptido. De los cuales 500 µl (aprox. 400 µg por péptido) se aplicarán con la inyección intradérmica.

Además de ser útiles para el tratamiento del cáncer, los péptidos de la presente invención también son útiles para el diagnóstico. Dado que los péptidos son generados por células de cáncer de páncreas y se ha determinado que dichos péptidos no están presentes o lo están en niveles bajos en tejidos normales, dichos péptidos pueden ser utilizados para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los péptidos reivindicados en las biopsias de tejido puede ayudar al histopatólogo a diagnosticar un cáncer. La detección de ciertos péptidos por medio de anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica puede advertir al histopatólogo de que la muestra es maligna o está inflamada o enferma en general, o puede ser utilizada como un biomarcador del cáncer de páncreas. La presencia de grupos de péptidos puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

La detección de los péptidos en una muestra de tejido enfermo puede ayudar a decidir si los tratamientos que implican al sistema inmunitario pueden ser beneficiosos, sobre todo si se sabe o se prevé que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo conocido con el que las células infectadas o cancerosas logran eludir la vigilancia del sistema inmunitario. Así pues, la presencia de los péptidos indica que dicho mecanismo no es utilizado por las células analizadas.

Los péptidos de la presente invención pueden ser utilizados para analizar las respuestas de los linfocitos contra ellos, como son las respuestas de los linfocitos T o las respuestas de anticuerpos contra el péptido o el péptido unido a moléculas de MHC. Estas respuestas de los linfocitos pueden ser utilizadas como marcadores pronósticos para decidir los pasos posteriores del tratamiento. Dichas respuestas también pueden ser utilizadas como marcadores indirectos en las estrategias de inmunoterapia destinadas a estimular respuestas linfocitarias a través de diferentes medios, como por ejemplo la vacunación con proteínas, ácidos nucleicos, materiales autólogos, o la transferencia de linfocitos de donantes. En el ámbito de la terapia génica, las respuestas de los linfocitos

contra los péptidos pueden tenerse en cuenta para la evaluación de efectos secundarios. El control regular de las respuestas de los linfocitos también puede ser una herramienta valiosa para el seguimiento en trasplantes, por ejemplo con el fin de detectar enfermedades del injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.

A continuación se describirá la presente invención con los ejemplos siguientes con alusión a las figuras adjuntas que describen las formas de realización preferidas de los mismos, sin que con ello se pretenda limitar la invención. A efectos de la presente invención, todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su integridad.

La Figura 1A-C muestra la sobrerepresentación de varios péptidos en tejidos normales (gris oscuro) y en el cáncer de páncreas (gris claro). La Figura 1D expone todas las estirpes celulares (gris oscuro), tejidos normales (gris) y tejidos cancerosos (gris claro) donde se ha detectado el péptido de ejemplo (FLFDGSANLV) (SEQ ID N.º 9).

Figura 1A) Gen: CTLA/CTLB, Péptido: FLAQQESEI(A*02) (SEQ ID N.º 1); Tejidos mostrados de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 cólores, 1 ovario, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas, 6 páncreas, 18 tumores de páncreas;

Figura 1B) Gen: PLEC, Péptido: SLQEEHVAVA (A*02), (SEQ ID N.º 2); Tejidos mostrados de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 cólores, 1 ovario, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 5

estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas, 6 páncreas, 18 tumores de páncreas;

Figura 1C) Gen: COL6A3, Péptido: FLVDGSSAL (A*02) (SEQ ID N.º 10); Tejidos mostrados de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 cólores, 1 ovario, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas, 6 páncreas, 18 tumores de páncreas;

Figura 1D) COL6A3, Péptido: FLFDGSANLV (A*02) (SEQ ID N.º 9); Tejidos mostrados de izquierda a derecha: 5 estirpes de células de cáncer de páncreas, 7 tejidos normales (1 colon, 6 pulmones), 85 tejidos cancerosos (2 cánceres de mama, 6 cánceres de colon, 4 cánceres de esófago, 3 cánceres de hígado, 56 cánceres de pulmón, 5 cánceres de páncreas, 3 cánceres de recto, 1 melanoma, 5 cánceres gástricos). El conjunto de tejidos normales era el mismo que en A-C, pero no se muestran los tejidos en que no hubo detección. Las discrepancias entre las listas de tipos de tumores de la figura 1D y de la tabla 4 serían consecuencia del mayor rigor aplicado en los criterios de selección de esta última (para más detalles véase la tabla 4). La figura 1D muestra una relación de todas las muestras en que se detectó la presentación del péptido Y, con independencia de los parámetros de sobrerepresentación y del control de calidad técnico de la muestra.

La Figura 1E – I muestra todas las estirpes celulares (gris oscuro), los tejidos normales (gris) y los tejidos tumorales (gris claro) donde se han detectado todos los péptidos mostrados a título de ejemplo. Figura 1E) Péptido: SVDVSPPKV (A*02) (SEQ ID N.º 4); Tejidos ordenados de izquierda a derecha: 1 estirpe celular, 3 cultivos primarios, 1 piel, 1 cáncer de vías biliares, 3 cánceres de cerebro, 1 cáncer de mama, 4 cánceres de esófago, 5 cánceres renales, 11 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ganglio linfático, 1 cáncer de ovario, 3 cánceres de páncreas, 1 cáncer de próstata, 3 cánceres de piel, 2

cánceres de vejiga urinaria, 3 cánceres de útero; Figura 1F) Péptido: LLVDDSFLLHTV (A*02) (SEQ ID N.º 5); Tejidos ordenados de izquierda a derecha: 2 estirpes celulares, 1 cultivo primario, 1 cáncer de vía biliar, 2 cánceres de cerebro, 1 cáncer de mama, 3 cánceres de esófago, 2 cánceres de vesícula biliar, 2 cánceres renales, 2 cánceres de hígado, 3 cánceres de pulmón, 7 cánceres de ovario, 2 cánceres de páncreas, 3 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de útero, Figura 1G) Péptido: IVDDLTINL (A*02) (SEQ ID N.º 8); Tejidos ordenados de izquierda a derecha: 1 estirpe celular, 1 cáncer de colon, 2 cánceres de esófago, 2 cánceres de vesícula biliar, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ganglio linfático, 1 cáncer de páncreas, 2 cánceres de piel, 4 cánceres de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria, 4 cánceres de útero, Figura 1H) Péptido: LLAGQTYHV (A*02) (SEQ ID N.º 13); Tejidos ordenados de izquierda a derecha: 6 estirpes celulares, 1 pulmón, 1 placenta, 2 cánceres de vías biliares, 3 cánceres de mama, 2 cánceres de colon, 2 cánceres de esófago, 2 cánceres de vesícula biliar, 1 cáncer de hígado, 36 cánceres de pulmón, 3 cánceres de ovario, 3 cánceres de páncreas, 1 cáncer de recto, 3 cánceres de vejiga urinaria; y Figura 1I) Péptido: VLAKPGVISV (A*02) (SEQ ID N.º 14); Tejidos ordenados de izquierda a derecha: 7 estirpes celulares, 1 pulmón, 1 cáncer de vías biliares, 4 cánceres de mama, 1 cáncer de colon, 2 cánceres de esófago, 1 cáncer de vesícula biliar, 36 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 3 cánceres de páncreas, 2 cánceres de recto, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria.

La Figura 2 muestra perfiles de expresión a modo de ejemplo (expresión relativa comparada con el riñón normal) de genes originarios de la presente invención que están fuertemente sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el cáncer de páncreas en un conjunto de tejidos normales (gris oscuro) y de 11 muestras de cáncer de páncreas (gris).

Figura 2A) LAMC2; Tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado,

1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena, y 18 tumores de páncreas;

Figura 2B) VCAN; Tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena, y 18 tumores de páncreas;

Figura 2C) FAP; Tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena, y 18 tumores de páncreas;

La Figura 3 muestra datos de inmunogenicidad a título de ejemplo: resultados de la citometría de flujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido. La Figura 3 (C y D) muestra resultados a título de ejemplo de respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-A*02⁺ obtenidas en condiciones *in vitro*. Los linfocitos T CD8⁺ fueron sensibilizados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-A*02 formando un complejo con el péptido de SEQ ID N.º 3 (C, recuadro izquierdo) o el péptido de SEQ ID N.º 50 (D, recuadro izquierdo), respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D de los multímeros con A*02/SEQ ID N.º 3 (C) o A*02/SEQ ID N.º 50 (D). Los recuadros de la derecha (C y D) muestra la tinción de control de células estimuladas con complejos A*02/péptido irrelevantes. Los linfocitos CD8⁺ se seleccionaron entre las células sueltas (singletes). Con selecciones booleanas se pudieron excluir los falsos positivos detectados con multímeros específicos de

diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de las células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Identificación y cuantificación de los péptidos asociados a tumor presentados en la superficie celular

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de los pacientes se obtuvieron de Asterand (Detroit, EE. UU. y Royston, Herts, Reino Unido); Geneticist Inc. (Glendale, California, EE. UU.); Hospital de Heidelberg; Hospital Universitario de Tubinga. Los tejidos normales se obtuvieron de Bio-Options Inc. (California, EE. UU.); BioServe (Beltsville, Maryland, EE. UU.); Capital BioScience Inc. (Rockville, Maryland, EE. UU.); Geneticist Inc. (Glendale, California, EE. UU.); Hospital Universitario de Ginebra; Hospital Universitario de Heidelberg; Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto (KPUM); Hospital Universitario de Múnich; ProteoGenex Inc. (Culver City, California, EE. UU.); Hospital Universitario de Tubinga. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica o la autopsia. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extirpación y permanecieron a -70 °C hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron por inmunoprecipitación de los tejidos sólidos siguiendo un protocolo ligeramente modificado (Falk et al., Nature 351 (1991): 290-296; Seeger et al., Immunogenetics 49 (1999): 571-576) con el anticuerpo específico de HLA-A*02 BB7.2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarosa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

Análisis por espectrometría de masas

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema nanoAcquity UPLC, Waters) y los péptidos

eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente de ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 μm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 1,7 μm (Waters) aplicando un caudal de 400 nl por minuto. Posteriormente los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos fases con 10% al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente nano-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). Los espectrómetros de masas LTQ-Orbitrap se hicieron funcionar en el modo dependiente de datos con el método TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el orbitrap ($R = 30\,000$), al que siguieron barridos EM/EM también en el orbitrap ($R = 7500$) con los 5 iones precursores más abundantes y exclusión dinámica de los iones preseleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia.

La cuantificación relativa de la CL-EM sin marcador se efectuó por recuento iónico, es decir por extracción y análisis de las características de CL-EM (Mueller et al., 2007). El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron, además, con deconvolución del estado de carga y alineamiento del tiempo de retención (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Por último, todas las características de CL-EM se cotejaron con los resultados de la identificación de secuencias para combinar los datos cuantitativos de muestras y tejidos diferentes con los perfiles de presentación de péptidos. Los datos cuantitativos se normalizaron en proporción dos tercios de acuerdo con la tendencia central para tener en cuenta la variación entre los duplicados técnicos y biológicos. De ese modo, cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo,

todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra, así como las variaciones de los duplicados. El perfil superpone muestras de cáncer de páncreas con muestras de tejido normal de referencia. En la Figura 2 se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrerrepresentados a modo de ejemplo. Las puntuaciones de presentación de los péptidos indicados a título de ejemplo se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Grados de presentación. La tabla enumera los péptidos que en los tumores aparecen sobrerrepresentados en diverso grado con respecto a un grupo de tejidos normales: En grado sumo (+++), acusado (++) y notable (+).

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido
1	FLAQQESEI	+++
2	SLQEEHVAVA	++
3	ALLTFMEQV	+++
4	SVDVSPPKV	+
5	LLVDDSFLHTV	+++
7	AQQESEIAGI	+++
8	IVDDLTLNL	+++
9	FLFDGSANLV	+++
10	FLVDGSSAL	+++
11	FLYKIIDEL	+++
12	FVSEIVDTV	+++
13	LLAGQTYHV	++
14	VLAKPGVISV	+
15	SLANNVTSV	+
16	APVNVTTTEVKSV	+++
17	FLKSGDAAIV	+++
18	SLLDDELMST	++
19	HLAPETDEDDL	+++
20	RLAGDGVGAV	++
21	HLMDQPLSV	+++
23	SLSAFTLFL	+

24	GLLEELVTV	+++
25	SLKEEVGEEAI	+
26	SLKEEVGEEAIV	++
29	FLQEYLDAI	+++
31	SLAAAAGKQEL	+++
32	SLAAAAGKQELA	+++
33	SLDSRLELA	+++
34	MLMPVHFL	+++
35	VMDSGDGVTHTV	+
36	KQEYDESGPSIVH	+++
37	GLLKKINSV	+++
38	NLVEKTPALV	+++
39	TLLSNLEEA	+
40	FILDSAETTTL	+++
41	FLLDGSEGV	+++
42	KLVDKSTEL	+++
43	RLDQRPQI	++
46	TFAPVNVTTTEVKSV	+
47	KMDASLGNLFA	+++
48	ALTQTGGPHV	+++
49	NLKGTFATL	+++
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	+++
52	RMVEEIGVEL	++
56	GLLDYATGAIGSV	+++
57	FLGKVVIDV	+++
58	GLAAFKAFL	+++
59	KLFNLSKEDDV	+++
61	ALEKDYEEVGV	+++
62	ALEKDYEEV	+++
63	FAGDDAPR	+++
64	FLVSNMLLAEA	+++
66	ALLSGLREA	+++
67	KMFFLIDKV	+++
68	KLLTEVHAA	+++
70	FLVDGSWSV	+++
71	FLLDGSANV	+++
74	KIQEILTQV	+++
75	RLDDLKMTV	++
76	RLLDSVSRL	+
77	GLTDNIHLV	+++

79	VLAPRVLRA	+
80	TLYPHTSQV	+
81	AMSSKFFLV	+++
82	SISDVIAQV	+++
83	FLIDSSEGV	+++
84	NLLDLDYEL	+++
85	TVAEVIQSV	++
86	SLLAQNTSWLL	++
87	LLLGSPAAA	+++

EJEMPLO 2

Perfil de expresión de los genes que codifican los péptidos de la invención

La sobrerepresentación o la presentación específica de un péptido en las células tumorales con respecto a las células normales es suficiente para que sea de utilidad en la inmunoterapia, y algunos péptidos son específicos de tumor aunque la proteína de la que proceden esté presente también en los tejidos normales. Además, la obtención de los perfiles de expresión del ARNm añade otro nivel de seguridad a la selección de las dianas peptídicas para la inmunoterapia. Concretamente para las opciones terapéuticas sujetas a un alto riesgo de seguridad, como los TCR madurados por afinidad, el péptido diana ideal será todo aquel derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no se halle en los tejidos normales.

Fuentes de ARN y preparación

Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por diversas instituciones (véase el Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras con TRI Reagent

(Ambion, Darmstadt, Alemania) y después se purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Ámsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, California, EE. UU.). El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción.

La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Experimentos con micromatrices

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2. 0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2. 0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes preprogramados en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos (*housekeeping*) suministrados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de señal dados por el software y la muestra normal de riñón se ajustó de forma arbitraria en 1,0. En la Figura

1 se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios de la presente invención que aparecen muy sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el cáncer de páncreas. Los grados de expresión de otros genes mostrados a título de ejemplo se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9: Grados de expresión. En la tabla se enumeran los péptidos derivados de genes que en los tumores aparecen sobrepresentados con respecto a un panel de tejidos normales, en grado sumo (+++), acusado (++) y notable (+).

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión génica
3	ALLTFMEQV	++
4	SVDVSPPKV	+
6	VLISLKQAPLV	+
13	LLAGQTYHV	+
15	SLANNVTSV	+
16	APVNVTTTEVKSV	+
20	RLAGDGVGAV	+
23	SLSAFTLFL	+
25	SLKEEVGEEAI	++
27	YLQGQRLDNV	+
30	VVDEGPTGV	++
36	KQEYDESGPSIVH	+
43	RLDQRPQI	+
44	VLLDKIKNLQV	+
46	TFAPVNVTTTEVKSV	++
47	KMDASLGNLFA	+
48	ALTQTGGPHV	+
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	++
52	RMVEEIGVEL	+
57	FLGKVVIDV	+
58	GLAAFKAFI	+
59	KLFNLSKEDDV	+
61	ALEKDYEEVG	+++
62	ALEKDYEEV	+++
66	ALLSGLREA	++
67	KMFFLIDKV	+

71	FLLDGSANV	+
73	TLVAIVVGV	++
75	RLDDLKMTV	++
76	RLLDSVSRL	+++
78	TLSSIKVEV	+++
81	AMSSKFFLV	++

EJEMPLO 3

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase I

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, los inventores llevaron a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de linfocitos T basado en estimulaciones reiteradas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo los inventores han podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 22 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 de la invención, lo cual demuestra que estos péptidos son epítomos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en humanos (Tabla 10).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, los inventores primero aislaron linfocitos T CD8+ de productos de leucoféresis HLA-A*02 por selección positiva con microperlas de CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) de donantes sanos obtenidas de la Clínica universitaria de Mannheim, Alemania, tras el preceptivo consentimiento informado.

Los linfocitos CD8+ o PBMC aislados se incubaron hasta su utilización en medio para linfocitos T (TCM) consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml / estreptomina 100 µg/ml (Cambrex, Colonia, Alemania), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemania), gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). En este paso al medio TCM también se le añadieron IL-7 2,5 ng/ml

(PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Novartis Pharma, Núremberg, Alemania).

La fabricación de las microperlas tapizadas con pMHC/anti-CD28, la estimulación de los linfocitos T y la lectura se llevaron a cabo en un sistema *in vitro* muy definido con cuatro moléculas pMHC distintas en cada condición de estimulación y 8 moléculas pMHC distintas en cada condición de lectura.

El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9. 3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humano (Jung et al., 1987) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,6 μm de diámetro recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.).

Los pMHC usados en las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV (SEQ ID N.º 88) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID N.º 88), respectivamente.

Placas de 96 pocillos se tapizaron con 800.000 microperlas / 200 μl en presencia de 4 x 12,5 ng de diferentes pMHC biotinilados, se lavaron y después se les añadió 600 ng de anti-CD28 biotinilado en un volumen de 200 μl . Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1×10^6 linfocitos T CD8+ con 2×10^5 microperlas recubiertas y lavadas en 200 μl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Para la lectura de los multímeros pMHC con 8 moléculas pMHC distintas por condición se empleó una estrategia de codificación combinatoria bidimensional según lo descrito en otro lugar (Andersen et al., 2012), con pequeñas modificaciones que comprenden el acoplamiento con 5 fluorocromos distintos. Por último, los análisis de los multímeros se llevaron a cabo tiñendo las células con el colorante vital Live/dead® del IR cercano (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con

anticuerpo anti-CD8-FITC clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) y multímeros pMHC fluorescentes. Para el análisis se equipó un citómetro BD LSRII SORP con los filtros y láseres adecuados. Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis multimérico se efectuó con el software FlowJo (Tree Star, Oregón, EE. UU.). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ multímero+ específicos se detectó comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de multímero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de cáncer de páncreas

En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En la Figura 3 se muestran a título de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de tres péptidos de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 2 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10: Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos HLA de clase I de la invención

Resultados a título de ejemplo de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante de los péptidos de la invención. <20% = +; 20 % - 49% = ++; 50% - 69%= +++; >= 70% = ++++

SEQ ID	Pocillos	Donantes
69	++	++++
87	+	+++

Los resultados de otros 7 péptidos más de la invención se resumen en la Tabla 10B.

Tabla 10B: Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos HLA de clase I de la invención.

Resultados a título de ejemplo de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante de los péptidos de la invención. <20% = +; 20 % - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70% = ++++

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]
3	ALLTFMEQV	++
20	RLAGDGVGAV	++++
21	HLMDQPLSV	+
23	SLSAFTLFL	++
34	MLMPVHFL	+
37	GLLKKINSV	+
50	ALAAILTRL	+++

EJEMPLO 4

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida estándar con el contrastado método de Fmoc. La identidad y la pureza de cada péptido se determinaron con espectrometría de masas y RP-HPLC analítica. Se obtuvieron los péptidos en forma de liofilizados blancos o blancuzcos (sal de trifluoroacetato) con una pureza superior al 50%. Todos los TUMAP se administraron preferiblemente como sales de trifluoroacetato o de acetato, aunque también es factible con otros tipos de sales.

EJEMPLO 5

Ensayos de unión a MHC

Los péptidos candidatos para los tratamientos con linfocitos T acordes con la presente invención se sometieron a nuevos análisis para determinar su capacidad de unión a MHC (afinidad). Los diferentes complejos de péptido-MHC se produjeron con intercambio de ligandos por UV, técnica en la que un péptido sensible a los rayos UV se escinde tras exponerlo a dicha radiación y se intercambia por el péptido de interés que se pretende analizar. Sólo los candidatos peptídicos que pueden unirse y estabilizar las moléculas de MHC receptoras del péptido evitan la disociación de los complejos MHC. Para determinar

el rendimiento de la reacción de intercambio se llevó a cabo un ELISA basado en la detección de la cadena liviana ($\beta 2m$) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo siguiendo la descripción general de Rodenko y cols. (Rodenko et al., 2006).

Placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) se incubaron toda la noche con estreptavidina 2 $\mu\text{g/ml}$ en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces y se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con un tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Como patrones se emplearon monómeros HLA-A*0201/MLA-001 replegados, en el intervalo de 15 a 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC resultantes de la reacción de intercambio por UV se diluyeron a 1:100 con tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con anticuerpo anti- $\beta 2m$ conjugado con HRP 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 h a 37 °C, se lavaron de nuevo y se revelaron con solución de TMB que se detuvo con NH_2SO_4 . La absorción se midió a 450 nm. Los péptidos candidatos que presentan un rendimiento de intercambio elevado (preferentemente superior al 50% y más preferentemente superior al 70%) se prefieren en general para la generación y la producción de anticuerpos o de fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o de fragmentos funcionales de los mismos, ya que muestran la suficiente avidéz hacia las moléculas MHC y evitan la disociación de los complejos MHC.

Tabla 11: Porcentajes de unión a MHC de clase I. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 % = +++; ≥ 75 % = ++++

SEQ ID. N.º	Secuencia	Cambio de péptido
-------------	-----------	-------------------

Lista de referencias bibliográficas

Agesen, T. H. et al., Gut 61 (2012)

Alhumaidi, A., Indian J Dermatol.Venereol.Leprol. 78 (2012)

Allison, J. P. et al., Science 270 (1995)

Amatschek, S. et al., Cancer Res 64 (2004)

Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. 7 (2012)

- Appay, V. et al., Eur.J Immunol. 36 (2006)
- Appetecchia, M. et al., J Exp.Clin Cancer Res 29 (2010)
- Arafat, H. et al., Surgery 150 (2011)
- Ariga, N. et al., Int J Cancer 95 (2001)
- Baek, G. et al., Cell Rep. 9 (2014)
- Bai, L. et al., J Cell Biochem. 113 (2012)
- Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001)
- Bausch, D. et al., Clin Cancer Res 17 (2011)
- Beatty, G. et al., J Immunol 166 (2001)
- Beggs, J. D., Nature 275 (1978)
- Bell, J. L. et al., Cell Mol Life Sci. 70 (2013)
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995)
- Bera, T. K. et al., Cancer Res 66 (2006)
- Berndt, S. I. et al., Nat Genet. 45 (2013)
- Blanch, A. et al., PLoS.One. 8 (2013)
- Blenk, S. et al., BMC.Cancer 8 (2008)
- Bo, H. et al., BMC.Cancer 13 (2013)
- Bouameur, J. E. et al., J Invest Dermatol. 134 (2014)
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng 16 (2003)
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brendle, A. et al., Carcinogenesis 29 (2008)
- Brossart, P. et al., Blood 90 (1997)
- Brown, S. G. et al., Prostate 75 (2015)
- Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004)
- Calmon, M. F. et al., Neoplasia. 11 (2009)

- Cao, H. H. et al., *Oncotarget*. (2014)
- Cappello, F. et al., *Curr.Pharm.Des* 19 (2013)
- Cappello, F. et al., *Cancer Biol.Ther* 7 (2008)
- Cappello, F. et al., *Front Biosci. (Schol.Ed)* 3 (2011)
- Capulli, M. et al., *J Bone Miner.Res* 27 (2012)
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* 53 (2004)
- Casagrande, G. et al., *Haematologica* 91 (2006)
- Catanzaro, J. M. et al., *Nat Commun.* 5 (2014)
- Chang, K. W. et al., *Anticancer Res.* 31 (2011)
- Chang, K. W. et al., *Hepatol.Res* 36 (2006)
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* 65 (2004)
- Chaudhury, A. et al., *Nat Cell Biol.* 12 (2010)
- Che, C. L. et al., *Int J Clin Exp.Pathol.* 6 (2013)
- Chen, B. et al., *Cancer Lett.* 354 (2014a)
- Chen, Q. et al., *PLoS.One.* 9 (2014b)
- Chen, R. et al., *Lab Invest* 95 (2015)
- Chen, S. et al., *Cancer Epidemiol.* 37 (2013a)
- Chen, S. T. et al., *Cancer Sci.* 102 (2011)
- Chen, Y. L. et al., *Int J Surg.* 11 (2013b)
- Cheon, D. J. et al., *Clin Cancer Res* 20 (2014)
- Cheung, H. C. et al., *BMC.Genomics* 9 (2008)
- Choi, W. I. et al., *Cell Physiol Biochem.* 23 (2009)
- Chow, S. N. et al., *Eur.J Gynaecol.Oncol* 31 (2010)
- Cine, N. et al., *Oncol Rep.* 32 (2014)
- Clement, S. et al., *Virchows Arch.* 442 (2003)

- Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. 16 (2003a)
- Cohen, C. J. et al., J Immunol 170 (2003b)
- Cohen, S. J. et al., Pancreas 37 (2008)
- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69 (1972)
- Coligan JE et al., (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. 176 (2006)
- Croner, R. S. et al., Int J Cancer 135 (2014)
- Csiszar, A. et al., Breast Cancer Res 16 (2014)
- Cucchiarelli, V. et al., Cell Motil.Cytoskeleton 65 (2008)
- Culler, M. D., Horm.Metab Res 43 (2011)
- Delaval, B. et al., Nat Cell Biol. 13 (2011)
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006)
- Denkberg, G. et al., J Immunol 171 (2003)
- Derycke, L. et al., Int J Dev.Biol. 55 (2011)
- Dhup, S. et al., Curr.Pharm.Des 18 (2012)
- Draoui, N. et al., Dis.Model.Mech. 4 (2011)
- Dutton-Regester, K. et al., Genes Chromosomes.Cancer 51 (2012)
- Egloff, A. M. et al., Cancer Res 66 (2006)
- Ellis, M. J. et al., Nature 486 (2012)
- Falk, K. et al., Nature 351 (1991)
- Feng, H. et al., J Clin Invest 124 (2014)
- Fillmore, R. A. et al., Exp.Biol.Med. (Maywood.) 239 (2014)
- Findeis-Hosey, J. J. et al., Biotech.Histochem. 87 (2012)
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98 (2001)
- Franz, M. et al., J Oral Pathol.Med. 39 (2010)

- Fu, Y. et al., *Cancer Biol.Ther* 5 (2006)
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* 2 (1996)
- Galmarini, C. M. et al., *Br.J Cancer* 88 (2003)
- Gamez-Pozo, A. et al., *PLoS.One.* 7 (2012)
- Gao, H. J. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* (2014a)
- Gao, J. et al., *PLoS.One.* 9 (2014b)
- Gao, Z. H. et al., *Histopathology* 65 (2014c)
- Gardina, P. J. et al., *BMC.Genomics* 7 (2006)
- Garg, M. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* 99 (2014)
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* 6 (2006)
- Geyik, E. et al., *Gene* 540 (2014)
- Glen, A. et al., *Prostate* 70 (2010)
- Glymph, S. et al., *Infect.Genet.Evol.* 16 (2013)
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003)
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9 (1997)
- Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* 21 (2014)
- Gorlov, I. P. et al., *Cancer Res* 67 (2007)
- Green MR et al., 4th, (2012)
- Greenfield EA, 2nd, (2014)
- Guo, C. et al., *Clin Chim.Acta* 417 (2013)
- Guo, C. et al., *Nat Commun.* 6 (2015)
- Gutgemann, A. et al., *Arch.Dermatol.Res* 293 (2001)
- Hait, W. N. et al., *Trans.Am Clin Climatol.Assoc.* 117 (2006)
- Han, J. C. et al., *World J Surg.Oncol* 13 (2015)
- Hao, X. et al., *J Membr.Biol.* 247 (2014)

- He, X. et al., Neoplasma 61 (2014)
- He, X. et al., Cancer Res 68 (2008)
- Hoffmann, N. E. et al., Cancer 112 (2008)
- Hopker, K. et al., EMBO J 31 (2012a)
- Hopker, K. et al., Cell Cycle 11 (2012b)
- Horibe, T. et al., Chembiochem. 15 (2014)
- Horinouchi, M. et al., Pediatr.Hematol.Oncol 27 (2010)
- Hu, S. et al., J Cancer Res Clin Oncol 140 (2014)
- Hu, W. et al., Cell Death.Dis. 4 (2013)
- Huang, H. C. et al., Technol.Cancer Res Treat. 9 (2010)
- Hurst, J. H. et al., Cell Mol Biol.Lett. 14 (2009)
- Hussey, G. S. et al., Mol Cell 41 (2011)
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. 179 (2007)
- Hyung, S. W. et al., Mol Cell Proteomics. 10 (2011)
- li, M. et al., Exp.Biol.Med. (Maywood.) 231 (2006)
- Isfort, R. J. et al., Oncogene 15 (1997)
- Ishiwata, T. et al., Oncol Rep. 18 (2007)
- Izaki, T. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 329 (2005)
- Jacob, M. et al., Curr.Mol Med. 12 (2012)
- Jaeger, E. et al., Nat Genet. 44 (2012)
- Jain, R. et al., Appl.Immunohistochem.Mol Morphol. 18 (2010)
- Januchowski, R. et al., Biomed.Res Int 2014 (2014)
- Jeda, A. et al., Ginekol.Pol. 85 (2014)
- Jeng, Y. M. et al., Br.J Surg. 96 (2009)
- Jeong, H. C. et al., J Proteome.Res 10 (2011)

- Jones, A. et al., EMBO Mol Med. 5 (2013)
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987)
- Kamino, H. et al., Cancer Genet. 204 (2011)
- Kaneko, K. et al., Pancreas 24 (2002)
- Kang, C. Y. et al., J Gastrointest.Surg. 18 (2014)
- Kang, G. H. et al., Lab Invest 88 (2008)
- Kanzawa, M. et al., Pathobiology 80 (2013)
- Karagiannis, G. S. et al., Oncotarget. 3 (2012)
- Kashyap, M. K. et al., Cancer Biol.Ther 8 (2009)
- Kashyap, V. et al., Mol Oncol 7 (2013)
- Katada, K. et al., J Proteomics. 75 (2012)
- Kevans, D. et al., Int J Surg.Pathol. 19 (2011)
- Khalaileh, A. et al., Cancer Res 73 (2013)
- Khuon, S. et al., J Cell Sci. 123 (2010)
- Kibbe AH, rd, (2000)
- Kido, T. et al., Genes (Basel) 1 (2010)
- Kim, M. et al., Mol Cancer Res 6 (2008)
- Kim, S. W. et al., OMICS. 15 (2011)
- Kirov, A. et al., J Cell Biochem. (2015)
- Kojima, M. et al., PLoS.One. 9 (2014)
- Koshikawa, K. et al., Oncogene 21 (2002)
- Kraya, A. A. et al., Autophagy. 11 (2015)
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. 5 (2006)
- Kuramitsu, Y. et al., Anticancer Res 30 (2010)
- Kuramitsu, Y. et al., Anticancer Res 31 (2011)

- Kuroda, N. et al., *Histol.Histopathol.* 20 (2005)
- Kuroda, N. et al., *Pathol.Int* 63 (2013)
- Kwon, J. et al., *Int J Oncol* 43 (2013)
- Lahsnig, C. et al., *Oncogene* 28 (2009)
- Lee, C. W. et al., *World J Surg.Oncol* 11 (2013a)
- Lee, H. W. et al., *Clin Cancer Res* 19 (2013b)
- Lee, H. W. et al., *Int J Oncol* 41 (2012)
- Lee, K. Y. et al., *J Med.* 35 (2004)
- Lee, M. A. et al., *BMC.Cancer* 14 (2014)
- Leivo, I. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 156 (2005)
- Leygue, E. et al., *Cancer Res* 58 (1998)
- Li, G. H. et al., *Bioinformatics.* 30 (2014)
- Li, X. et al., *Clin Cancer Res* 20 (2014)
- Li, X. et al., *PLoS.One.* 8 (2013)
- Li, Y. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 198 (2010)
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18 (2012)
- Lieveld, M. et al., *Virchows Arch.* 465 (2014)
- Lim, R. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 406 (2011)
- Lim, W. et al., *J Cancer Prev.* 18 (2013)
- Lin, H. C. et al., *J Proteome.Res* 12 (2013a)
- Lin, L. et al., *Oncol Lett.* 6 (2013b)
- Linge, A. et al., *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 53 (2012)
- Liu, H. et al., *Carcinogenesis* 34 (2013a)
- Liu, M. et al., *Reprod.Sci.* 20 (2013b)
- Liu, X. F. et al., *Apoptosis.* 14 (2009)

- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. 162 (1985)
- Long, Z. W. et al., Tumour.Biol. 35 (2014)
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. 690 (1993)
- Lu, C. et al., Dig.Dis.Sci. 58 (2013a)
- Lu, X. et al., Cancer Biother.Radiopharm. 28 (2013b)
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78 (1981)
- Lund, R. R. et al., Proteomics. 12 (2012)
- Lundblad RL, 3rd, (2004)
- Lung, H. L. et al., Int.J Cancer 127 (2010)
- Luo, Y. et al., Mol Med.Rep. 9 (2014)
- Lv, T. et al., PLoS.One. 7 (2012)
- Manning, T. J., Jr. et al., Cell Motil.Cytoskeleton 45 (2000)
- Marg, A. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 401 (2010)
- Matassa, D. S. et al., Cell Death.Dis. 4 (2013)
- Matchett, K. B. et al., Adv.Exp.Med.Biol. 773 (2014)
- Mazieres, J. et al., Oncogene 24 (2005)
- McCluggage, W. G. et al., Semin.Diagn.Pathol. 22 (2005)
- McIntyre, J. C. et al., Nat Med. 18 (2012)
- Medjkane, S. et al., Nat Cell Biol. 11 (2009)
- Meng, F. et al., Int J Oncol 43 (2013)
- Menhofer, M. H. et al., PLoS.One. 9 (2014)
- Mentlein, R. et al., Biol.Chem. 392 (2011)
- Meziere, C. et al., J Immunol 159 (1997)
- Milani, C. et al., BMC.Cancer 13 (2013)
- Miyagi, T. et al., Mol Urol. 5 (2001)

- Mochizuki, S. et al., Cancer Sci. 98 (2007)
- Modlin, I. M. et al., Aliment.Pharmacol.Ther 31 (2010)
- Morgan, R. A. et al., Science 314 (2006)
- Mori, M. et al., Transplantation 64 (1997)
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. 12 (2006)
- Mu, Y. et al., Electrophoresis 34 (2013)
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res 7 (2008)
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. 7 (2007)
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 (1999)
- Mushinski, J. F. et al., J Biol.Chem. 284 (2009)
- Nakamura, H. et al., Curr.Pharm.Des 19 (2013)
- Nakayama, H. et al., J Clin Pathol. 55 (2002)
- Nassar, Z. D. et al., Oncotarget. 4 (2013)
- Niedergethmann, M. et al., Br.J Cancer 97 (2007)
- Nikolova, D. N. et al., Oncol Rep. 20 (2008)
- Nishioka, M. et al., Oncogene 19 (2000)
- Olesen, S. H. et al., Mol Cell Proteomics. 4 (2005)
- Ou, Y. et al., Urol.Oncol 32 (2014)
- Pace, A. et al., Curr.Pharm.Des 19 (2013)
- Pan, S. et al., OMICS. 13 (2009)
- Panico, F. et al., Adv.Cancer Res 105 (2009)
- Patel, R. A. et al., Cancer Res 72 (2012)
- Pereira, P. M. et al., Org.Biomol.Chem. 12 (2014)
- Pinheiro J et al., (2015)
- Pitule, P. et al., Anticancer Res 33 (2013)

- Pivonello, C. et al., *Infect.Agent.Cancer* 9 (2014)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995)
- Pontisso, P., *Ann Hepatol.* 13 (2014)
- Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994)
- Portela-Gomes, G. M. et al., *Regul.Pept.* 146 (2008)
- Qi, Y. et al., *Proteomics.* 5 (2005)
- Qu, Z. et al., *Cancer Med.* 3 (2014)
- Quinn, M. C. et al., *Int J Oncol* 42 (2013)
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999)
- Reddy, S. P. et al., *Clin Cancer Res* 14 (2008)
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18 (2002)
- Rehman, I. et al., *PLoS.One.* 7 (2012)
- Rini, B. I. et al., *Cancer* 107 (2006)
- Robinson, T. J. et al., *Cell Cycle* 12 (2013)
- Rock, K. L. et al., *Science* 249 (1990)
- Roman-Gomez, J. et al., *Blood* 109 (2007)
- Roustit, M. M. et al., *J Endocrinol.* 223 (2014)
- Roy, D. et al., *Blood* 118 (2011)
- Rucki, A. A. et al., *World J Gastroenterol.* 20 (2014)
- S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 032-010OL, (2013)
- Saiki, R. K. et al., *Science* 239 (1988)
- Salman, B. et al., *Oncoimmunology.* 2 (2013)
- Sato, Y. et al., *J Cell Sci.* 126 (2013)
- Savoy, R. M. et al., *Endocr.Relat Cancer* 20 (2013)
- Schlomann, U. et al., *Nat Commun.* 6 (2015)

- Schroder, W. A. et al., Cancer Med. 3 (2014)
- Schulte, J. et al., Histochem.Cell Biol. 138 (2012)
- Scrideli, C. A. et al., J Neurooncol. 88 (2008)
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics 49 (1999)
- Seya, T. et al., Oncol Rep. 16 (2006)
- Sherman F et al., (1986)
- Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell 3 (2003)
- Simiczjew, A. et al., Histochem.Cell Biol. 142 (2014)
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004)
- Skondra, M. et al., Anticancer Res 34 (2014)
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. 24 (2006)
- Smith, M. J. et al., Br.J Cancer 100 (2009)
- Song, B. L. et al., Biochem.J 394 (2006)
- Song, Q. et al., Tumour.Biol. 35 (2014)
- Sood, A. K., Immunol Res 46 (2010)
- Soucek, J. J. et al., Br.J Cancer 111 (2014)
- Stolk, J. A. et al., Prostate 60 (2004)
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. 9 (2008)
- Sun, D. W. et al., Cancer Epidemiol. (2015a)
- Sun, J. et al., J Mol Histol. 46 (2015b)
- Sun, Z. et al., J Proteome.Res 13 (2014)
- Suzuki, H. et al., Int J Oncol 12 (1998)
- Szarvas, T. et al., Int J Cancer 135 (2014)
- Takahashi, K. et al., Peptides 27 (2006)
- Takeuchi, A. et al., Mol Cell Endocrinol. 384 (2014)

- Tatenhorst, L. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. 63 (2004)
- Terabayashi, T. et al., PLoS.One. 7 (2012)
- Terada, T. et al., J Hepatol. 24 (1996)
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. 62 (2005)
- Thorsen, K. et al., Mol Cell Proteomics. 7 (2008)
- Tran, E. et al., Science 344 (2014)
- Trougakos, I. P., Gerontology 59 (2013)
- Tummala, R. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. 64 (2009)
- Unger, K. et al., Endocr.Relat Cancer 17 (2010)
- Untergasser, G. et al., Mech.Ageing Dev. 126 (2005)
- Vassar, R. et al., J Neurochem. 130 (2014)
- Von Hoff, D. D. et al., N.Engl.J Med. 369 (2013)
- Vui-Kee, K. et al., Kaohsiung.J Med.Sci. 28 (2012)
- Walker, E. J. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014)
- Walter, S. et al., J Immunol 171 (2003)
- Walter, S. et al., Nat Med. 18 (2012)
- Wang, G. H. et al., Oncol Lett. 5 (2013a)
- Wang, H. et al., Front Oncol 4 (2014a)
- Wang, J. et al., J Exp.Clin Cancer Res 34 (2015)
- Wang, Q. et al., PLoS.One. 8 (2013b)
- Wang, X. et al., Urol.Int. 92 (2014b)
- Wang, X. Y. et al., Int J Hyperthermia 29 (2013)
- Watson, M. B. et al., Acta Oncol 46 (2007)
- Watt, H. L. et al., Mol Cell Endocrinol. 286 (2008)
- Weber, A. M. et al., Pharmacol.Ther (2014)

- Wikberg, M. L. et al., *Tumour.Biol.* 34 (2013)
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999)
- Williams, S. et al., *PLoS.One.* 8 (2013)
- Wong, C. C. et al., *Nat Genet.* 46 (2014)
- World Cancer Report, (2014)
- Xia, Z. K. et al., *Dis.Esophagus.* 25 (2012)
- Xie, X. et al., *Oncol Lett.* 7 (2014)
- Xiong, D. et al., *Carcinogenesis* 33 (2012)
- Xu, C. Z. et al., *Int J Clin Exp.Pathol.* 6 (2013)
- Yang, C. Y. et al., *J Immunol* 192 (2014a)
- Yang, H. et al., *PLoS.One.* 9 (2014b)
- Yang, S. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1772 (2007)
- Yasui, W. et al., *Cancer Sci.* 95 (2004)
- Yeung, T. L. et al., *Cancer Res* 73 (2013)
- Yu, X. et al., *Cancer Res* 73 (2013)
- Yuan, B. et al., *Immunobiology* 217 (2012)
- Yuan, D. et al., *J Surg.Oncol* 108 (2013)
- Yuan, R. H. et al., *Ann Surg.Oncol* 16 (2009)
- Zanaruddin, S. N. et al., *Hum.Pathol.* 44 (2013)
- Zaravinos, A. et al., *PLoS.One.* 6 (2011)
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* 57 (1997)
- Zhang, C. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 434 (2013)
- Zhang, C. C. et al., *Cancer Res* 59 (1999)
- Zhang, Y. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* 14 (2006)
- Zhang, Y. et al., *Cancer Lett.* 303 (2011)

Zhao, D. et al., J Neurooncol. 118 (2014)

Zhao, Z. K. et al., Tumour.Biol. 34 (2013)

Zhu, H. H. et al., Asian Pac.J Trop.Med. 7 (2014)

Zocchi, M. R. et al., Blood 119 (2012)

Zou, T. T. et al., Oncogene 21 (2002)