

PÉPTIDOS Y COMBINACIÓN DE PÉPTIDOS Y ANDAMIAJES NOVEDOSOS PARA SU USO EN INMUNOTERAPIA CONTRA CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES (RCC) Y OTROS CÁNCERES

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 epitopes peptídicos para linfocitos T asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que pueden servir por ejemplo como principios activos farmacéuticos en composiciones de vacunas destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales, o para estimular células T *ex vivo* y transferirlas a los pacientes. Los péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o los péptidos como tales, también pueden ser blanco de anticuerpos, receptores solubles de células T, y otras moléculas de unión.

La presente invención se relaciona con diferentes secuencias peptídicas novedosas y sus variantes derivadas de moléculas de HLA clase I de células de tumor humano que pueden usarse en composiciones para vacunas para generar respuestas inmunológicas antitumorales, o como blancos para el desarrollo de compuestos farmacéuticamente / inmunológicamente activos y células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de riñón es más común en hombres y es el noveno cáncer más común en hombres (214.000 casos) y el 14^{to} más común en mujeres (124.000 casos) en el mundo en 2012. El 70% de los casos nuevos se produjeron en países con niveles altos y muy altos de desarrollo humano, con 34% de los nuevos casos estimados en Europa y el 19% en Norteamérica. Se produjeron unas 143.000 muertes estimadas de cáncer de riñón en 2012 (91.000 en hombres, 52.000 en mujeres); el cáncer de riñón es la 16^{ta} causa más común de muerte de cáncer en el mundo.

Las mayores tasas de incidencia se encuentran en la República Checa. También se encuentran tasas elevadas en el norte y este de Europa, Norteamérica, y Australia. En la mayor parte de África y el este de Asia se estiman tasas bajas. La tasa de fatalidad de casos es menor en países muy desarrollados (relación de mortalidad a incidencia total,

0,4) que en países con niveles bajos o medios de desarrollo humano (0,5). Solo el 3,1% de los casos se diagnosticaron en África, pero solo se produjo un 5,7% de muertes en esta región. Las tasas de incidencia y mortalidad han ido aumentando en muchos países, a lo largo de diferentes niveles de desarrollo humano (World Cancer Report, 2014).

La mayor parte de los cánceres renales son carcinomas de células renales (RCC), una clase heterogénea de tumores que surgen de diferentes tipos celulares en el parénquima renal. La mayoría son carcinomas renales de células claras (aproximadamente 70% de los casos de cáncer renal), seguido por carcinomas de células renales papilares (entre 10 y 15%), cromóforas (aproximadamente 5%), y del ducto colector (<1%). Cada uno de estos subtipos de tumores de células renales tiene características genéticas distintivas (Moch, 2013; World Health Organization Classification of Tumours, 2004).

El carcinoma de células renales (RCC) se caracteriza por una falta de signos de alerta tempranos, manifestaciones clínicas diversas, y resistencia a radiación y quimioterapia. Un total de entre 25 y 30% de los pacientes con RCC inicialmente presentan metástasis aparentes (Hofmann y col., 2005). Aproximadamente un tercio de los pacientes con RCC desarrollarán enfermedad metastásica con el tiempo. Por consiguiente, casi entre el 50 y 60% de todos los pacientes con RCC eventualmente presentarán enfermedad metastásica (Bleumer y col., 2003; Hofmann y col., 2005). Entre aquellos con enfermedad metastásica, aproximadamente el 75% tienen metástasis de pulmón, 36% involucrados los nódulos linfáticos y/o tejidos blandos, 20% involucrados el hueso, y 18% involucrados el hígado (Sachdeva y col., 2010).

Los pacientes con RCC con enfermedad metastásica que reciben terapia sistémica de primera línea basada en citoquinas pueden categorizarse en grupos de riesgo predictivos para la supervivencia en base a los 5 factores pronósticos (Motzer y col., 2004). Las características del pretratamiento asociadas con una supervivencia más corta fueron bajo estado de rendimiento de Karnofsky (<80%), alta lactato deshidrogenasa sérica (>1,5 ULN), baja hemoglobina (<LLN), alto calcio sérico corregido (>10 mg/dL), y time entre el diagnóstico y tratamiento <1 año. En base a estos factores de riesgo, los pacientes se categorizaron en tres grupos de riesgo. La mediana del tiempo

a la muerte en el 18% de los pacientes con cero factores de riesgo (riesgo favorable) fue 30 meses. El 62% de los pacientes tuvo uno o dos factores de riesgo (riesgo intermedio), y la mediana del tiempo de supervivencia en este grupo fue de 14 meses. Los pacientes con 3 o más factores de riesgo (riesgo pobre) que comprendieron el 20% de los pacientes, tuvieron una mediana del tiempo de supervivencia de 5 meses. La aplicación de esta categorización del grupo de riesgo MSKCC ha sido aplicada ampliamente en ensayos clínicos de RCC avanzado. La categorización del riesgo puede usarse para planear e interpretar los resultados de ensayos clínicos y para dirigir la terapia.

Los factores de riesgo de RCC son el fumar cigarrillos y la obesidad. Con diferentes metaanálisis se confirmó que el haber fumado alguna vez aumenta el riesgo de cáncer renal en comparación con el que nunca ha fumado (Cho y col., 2011; Hunt y col., 2005). También hay un aumento dependiente de la dosis en el riesgo relacionado con el número de cigarrillos fumados por día. El riesgo disminuye en el periodo de 5 años luego de haber dejado de fumar. El sobrepeso, especialmente la obesidad, es un factor de riesgo para el cáncer renal en las mujeres y en los hombres (Ljungberg y col., 2011). Se ha estimado que la proporción de todos los casos de cáncer renal atribuible al sobrepeso y la obesidad es aproximadamente 40% en los EE.UU. y de hasta el 40% en los países europeos (Renehan y col., 2008; Renehan y col., 2010). Los mecanismos por los cuales la obesidad influye en la carcinogénesis renal no son claros. Las hormonas esteroides sexuales pueden afectar la proliferación de las células renales por efectos mediados por el receptor endócrino. La obesidad con los trastornos endócrinos combinados, tales como niveles disminuidos de globulina de unión a hormonas sexuales y progesterona, resistencia a insulina, y niveles aumentados de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), pueden contribuir a la carcinogénesis renal. Recientemente, un estudio de control de casos informó una asociación fuerte del carcinoma de células claras con la obesidad (World Cancer Report, 2014).

El tratamiento inicial comúnmente es la remoción parcial o completa del o los riñones afectados y sigue siendo la base del tratamiento curativo (Rini y col., 2008). Para el tratamiento de primera línea de los pacientes con puntuación de pronóstico pobre, una guía elaborada por las diferentes organizaciones y sociedades contra el cáncer

recomiendan los inhibidores del receptor de tirosina quinasa (TKI) sunitinib (Sutent®) y pazopanib (Votrient®), el anticuerpo monoclonal bevacizumab (Avastin®) combinado con interferón- α (IFN- α) y el inhibidor de mTOR temsirolimus (Torisel®). En base a las guías elaboradas por US NCCN así como la EAU europea y ESMO, se recomiendan los TKI sorafenib, pazopanib o recientemente axitinib como terapia de segunda línea en pacientes con RCC que han fallado a la terapia previa con citoquinas (IFN- α , IL-2). Las guías de NCCN sugieren también dsunitinib en este contexto (nivel alto de evidencia de acuerdo con la Categoría I de NCCN).

Se recomiendan everolimus y axitinib como terapia de segunda línea de aquellos pacientes que no se han beneficiado con una terapia dirigida a VEGF con TKI de acuerdo con las guías establecidas.

La inmunogenicidad conocida de RCC ha representado la base que apoya el uso de inmunoterapia y vacunas contra el cáncer en el RCC avanzado.

La correlación interesante entre la expresión de PD-1 en linfocitos y el estadio avanzado, grado y pronóstico de RCC así como la expresión selectiva de PD-L1 por las células tumorales de RCC y su potencial asociación con resultados clínicos peores, han llevado al desarrollo de nuevos agentes anti-PD-1/PD-L1, solos o en combinación con fármacos antiangiogénicos u otras estrategias inmunoterapéuticas, para el tratamiento de RCC (Massari y col., 2015).

En el RCC avanzado, un ensayo clínico de fase III con vacuna contra el cáncer llamado estudio TRIST evalúa si TroVax (una vacuna que usa un antígeno asociado a tumor, 5T4, con un vector del virus), agregado a la terapia de primera línea estándar para el cuidado, prolonga la supervivencia de los pacientes con mRCC o localmente avanzado. La mediana de la supervivencia no ha sido alcanzada en ninguno del grupo con 399 pacientes (54%) remanentes en el estudio sin embargo el análisis de los datos confirma los resultados clínicos previos, demostrando que TroVax es inmunológicamente activo y que hay una correlación entre la potencia de la respuesta de anticuerpo específico por 5T4 y la supervivencia mejorada. Además hay diferentes estudios en la búsqueda de vacunas peptídicas con el uso de la sobreexpresión de epitopes en RCC.

Ha habido diferentes estrategias de vacunas contra tumores bajo investigación.

Se han hecho estudios sobre el uso de estrategias sobre el tumor completo, incluyendo lisados de células tumorales, fusiones de células dendríticas con células tumorales, o ARN de tumor completo en pacientes con RCC, y se informaron remisiones de lesiones del tumor en algunos de estos ensayos (Avigan y col., 2004; Holtl y col., 2002; Marten y col., 2002; Su y col., 2003; Wittig y col., 2001).

En los últimos años, se han definido diferentes TAA humanos expresados en RCC y reconocidos por CTL específicos de antígeno y se han caracterizado usando clonado de expresión, estrategia de inmunología reversa, o por aplicación de tecnología de microarreglo de ADN (Dannenmann y col., 2013; Michael y Pandha, 2003; Minami y col., 2014; Renkvist y col., 2001; Wierecky y col., 2006).

Considerando estos efectos secundarios severos y los costos asociados con el tratamiento del cáncer, existe una necesidad de identificar factores que puedan usarse en el tratamiento del cáncer en general y RCC en particular. También existe una necesidad de identificar factores que representen biomarcadores para el cáncer en general y RCC en particular, que lleven a un mejor diagnóstico del cáncer, evaluación del pronóstico, y predicción del éxito del tratamiento.

La inmunoterapia del cáncer representa una opción de direccionamiento específico a células del cáncer a la vez que se minimizan los efectos secundarios. La inmunoterapia contra el cáncer hace uso de la existencia de antígenos asociados al tumor. La clasificación actual de los antígenos asociados a tumor (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 espermatoцитos/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 o el NY-ESO-1.

b) Antígenos de diferenciación: Estos TAA están presentes tanto en los tumores como en el tejido normal del que deriva el tumor. La mayoría de los antígenos de diferenciación conocidos se encuentran en melanomas y en 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 epitopes 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 por un tumor (o asociación) de un péptido también puede surgir si el péptido se origina de un exón de tumor (asociado) en caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas).

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 epitopes nuevos en tumores como

MUC1 o 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 cervical.

La inmunoterapia en base a células T está dirigida a epitopes peptídicos derivados de proteínas asociadas a tumor o específicas de tumor, que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T específicos de tumor, es decir, los epitopes de los mismos, pueden ser moléculas derivadas de todas las clases de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que se expresan y, en comparación a células no alteradas del mismo origen, usualmente están sobreexpresadas en las células del respectivo tumor.

Hay dos clases de moléculas de MHC, MHC de clase I y MHC de clase II. Las moléculas de MHC de clase I están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina, las moléculas de MHC de clase II de una cadena alfa y una beta. Sus conformaciones tridimensionales generan un hueco de unión, que se usa para interacciones no covalentes con péptidos.

Las moléculas de MHC de clase I pueden encontrarse en la mayoría de las células nucleadas. Ellas presentan péptidos que resultan del clivaje proteolítico de proteínas predominantemente endógenas, productos ribosomales defectuosos (DRIP) y péptidos más grandes. Sin embargo, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o fuentes exógenas también se encuentran frecuentemente en moléculas de MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación de clase I se refiere como presentación cruzada en la literatura (Brossart y Bevan, 1997; Rock y col., 1990). Las moléculas de MHC de clase II pueden encontrarse predominantemente sobre células presentadoras de antígeno profesionales (APC), y principalmente presentan péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son incorporadas por las APC por ejemplo

durante la endocitosis, y posteriormente son procesadas.

Los complejos de péptido y MHC de clase I son reconocidas por células T positivas para CD8 que portan el receptor de células T apropiado (TCR), mientras que los complejos de péptido y moléculas de MHC de clase II son reconocidos por células T colaboradoras positivas para CD4 que portan el TCR apropiado. Se conoce bien que el TCR, el péptido y el MHC son de esta manera presentados en una cantidad estequiométrica de 1:1:1.

Las células T colaboradoras positivas para CD4 tienen un papel importante en la inducción y sostenimiento de las respuestas eficaces de las células T citotóxicas positivas para CD8. La identificación de epitopes de células T positivas para CD4 derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) es de gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos para iniciar respuestas inmunológicas antitumorales (Gnjatic y col., 2003). En el sitio del tumor, las células T colaboradoras, proveen el medio de citoquinas amigable con las células T citotóxicas (CTL) (Mortara y col., 2006) y atraen células efectoras, por ejemplo CTL, células asesinas naturales (NK), macrófagos, y granulocitos (Hwang y col., 2007).

En ausencia de inflamación, la expresión de moléculas de MHC de clase II está principalmente restringida a células del sistema inmunológico, especialmente células presentadoras de antígeno profesionales (APC), por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos, células dendríticas. En pacientes con cáncer, se ha encontrado que las células tumorales expresan moléculas de MHC de clase II (Dengjel y col., 2006).

Los péptidos elongados (alargados) de la invención pueden actuar como epitopes activos del MHC de clase II.

Las células T colaboradoras, activadas por epitopes del MHC de clase II, cumplen un papel importante en orquestar la función efectora de CTL en la inmunidad antitumoral. Los epitopes de las células T colaboradoras que inician una respuesta de célula T colaboradora del tipo TH1 apoyan funciones efectoras de las células T asesinas positivas para CD8, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra células tumorales que presentan complejos de péptidos asociados a tumor/MHC en su superficie celular. En

este sentido los epitopes de los péptidos de las células T colaboradoras asociados a tumor, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumor, pueden servir como ingredientes farmacéuticos activos de composiciones para vacuna que estimulan respuestas inmunológicas antitumorales.

Se mostró en modelos animales mamíferos, por ejemplo, ratones, que incluso en ausencia de linfocitos T positivos para CD8, células T positivas para CD4 son suficientes para inhibir la manifestación de tumores mediante la inhibición de la angiogénesis por secreción de interferón-gamma (IFN γ) (Beatty y Paterson, 2001; Mumberg y col., 1999). Existe evidencia de células T CD4 como efectoras directas antitumorales (Braumuller y col., 2013; Tran y col., 2014a).

Debido a que la expresión constitutiva de moléculas de HLA de clase II usualmente está limitado a células del sistema inmunológico, la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no fue considerada previamente como posible. Sin embargo, Dengjel y col. tuvieron éxito en la identificación de un número de epitopes de MHC de clase II directamente de tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Debido a que ambos tipos de respuestas, dependientes de CD8 y CD4, contribuyen en conjunto y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de antígenos asociados a tumores reconocidos por células T CD8+ (ligando: molécula de MHC de clase I + epitope del péptido) o por células T colaboradoras positivas para CD4 (ligando: molécula de MHC de clase II + epitope del péptido) es importante en el desarrollo de vacunas contra tumores.

Para que un péptido de MHC de clase I inicie (produzca) una respuesta inmunológica celular, también debe unirse a una molécula MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula de MHC y polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos de unión a MHC-clase-I usualmente tienen entre 8 y 12 residuos aminoácidos de longitud y usualmente contienen dos residuos conservados (“anclajes”) en su secuencia que interactúan con el hueco de unión de la molécula de MHC. En este sentido cada alelo de MHC tiene un “motivo de unión” que determina qué péptidos pueden unirse específicamente al hueco de unión.

En la reacción inmunológica que depende de la MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a determinadas moléculas de MHC de clase I expresadas por las células tumorales, sino que también deben tener que ser reconocidas por células T que portan receptores de células T (TCR) específicos.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T como antígenos específicos de o asociados a tumores, y para ser usadas en una terapia, deben cumplirse prerequisites particulares. El antígeno debe ser expresado principalmente por las células tumorales y no, o en cantidades comparablemente pequeñas, por los tejidos sanos normales. En una forma de realización preferida, el péptido debe presentarse mayoritariamente por las células tumorales en comparación a los tejidos sanos normales. Adicionalmente se desea que el antígeno respectivo no está solo presente en un tipo de tumor, sino en concentraciones altas (es decir número de copias del respectivo péptido por células). Los antígenos específicos de tumor o asociados a tumor con frecuencia derivan de otras proteínas directamente involucradas en la transformación de una célula normal a una célula tumoral debido a su función, por ejemplo en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Adicionalmente, los blancos corriente abajo de las proteínas causales directamente de una transformación pueden estar sobreexpresados y por lo tanto asociados a tumor indirectamente. Dichos antígenos asociados indirectamente a tumor también pueden ser blancos de una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja y col., 2004). Es esencial que los epitopes estén presentes en la secuencia de aminoácidos del antígeno, con el objetivo de asegurar que dicho péptido (“péptido inmunogénico”), derivado de un antígeno asociado a tumor, conduzca a una respuesta *in vitro* o *in vivo* de células T.

Básicamente, cualquier péptido con capacidad de unirse a una molécula de MHC puede funcionar como un epitope de célula T. Un prerequisite para la inducción de una respuesta de células T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de una célula T que tiene un TCR correspondiente y la ausencia de tolerancia inmunológica para este epitope particular.

Por lo tanto, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia en base a células T que incluye pero no se limita a vacunas contra tumores. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA se basan usualmente en el uso de células T que

pueden aislarse de pacientes o sujetos sanos, o se basan en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión de péptidos diferenciales entre los tejidos tumorales y normales. Sin embargo, la identificación de genes sobreexpresados en tejidos tumorales o líneas de células tumorales de humano, o selectivamente expresados en dichos tejidos o líneas celulares, no provee información precisa sobre el uso de los antígenos que están siendo transcritos a partir de estos genes en una terapia inmunológica. Esto se debe a que solo una subpoblación individual de epitopes de estos antígenos son adecuados para dicha aplicación ya que tiene que estar presente una célula T con un TCR correspondiente y la tolerancia inmunológica por este epitope particular requiere estar ausente o ser mínima. En una forma de realización muy preferida de la invención es importante por lo tanto seleccionar solo aquellos péptidos principal o selectivamente presentados contra los cuales puede encontrarse una célula T funcional y/o proliferante. Dicha célula T funcional se define como una célula T, la cual con la estimulación con un antígeno específico puede expandirse clonalmente y tiene la capacidad de ejecutar funciones efectoras ("célula T efectora").

En el caso de dirigir TCR específicos a péptido-MHC (por ejemplo TCR solubles) y anticuerpos u otras moléculas de unión (esqueletos) de acuerdo con la invención, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En estos casos, la presentación es el factor determinante.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

En un primer aspecto de la presente invención, la presente invención se relaciona con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114 o una secuencia variante de las mismas que es por lo menos 77%, preferiblemente por lo menos 88%, homóloga (preferiblemente por lo menos 77% o por lo menos 88% idéntica) a la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114, en donde la mencionada variante se une a MHC y/o induce la reactividad cruzada de células T con el mencionado péptido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde dicho péptido no es el polipéptido subyacente de longitud completa.

Las siguientes tablas muestran los péptidos de acuerdo con la presente invención, sus respectivas SEQ ID NOs, y la fuente de potenciales (subyacente) genes para estos

péptidos. Todos los péptidos en la Tabla 1 y Tabla 2 se unen a HLA-A*02. Los péptidos en la Tabla 2 se han descrito antes en grandes listados como resultado de tamizajes de alto rendimiento con tasas de error altas o calculados usando algoritmos, pero hasta el momento no han sido asociados con el cáncer. Los péptidos en la Tabla 3 son péptidos adicionales que pueden ser útiles en la combinación con los otros péptidos de la invención. Los péptidos en las tablas 4A y B son útiles adicionalmente para el diagnóstico y/o tratamiento de otras malignidades diferentes que involucran una sobreexpresión o sobre presentación del respectivo polipéptido subyacente.

Tabla 1: Péptidos de acuerdo con la presente invención

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
1	ALIVSLPYL	10786	SLC17A3
2	ILWREVVT	3299	HSF4
3	RLLGEVQAL	3299	HSF4
4	FLSQDIITV	5972	REN
5	YLYPNLTRL	6540	SLC6A13
6	VLFELSKTV	23250	ATP11A
7	FLLSLIDRL	112399	EGLN3
8	GLASFKSFL	8490	RGS5
9	ILLQKPDSV	8490	RGS5
10	KLLQNNYGL	8490	RGS5
11	FIQTEAPKEV	8490	RGS5
12	ALDPGSGNQLI	54437	SEMA5B
13	KIMAQILTV	120892	LRRK2
14	ALLTETIFL	120892	LRRK2
15	ILIKHLVKV	143872	ARHGAP42
16	FMPEELPQL	55258	THNSL2
17	ILAQQVHAL	113220	KIF12
18	YVLDLAAKV	47	ACLY
19	LLDPGSLQL	646658	SYNDIG1L
20	AVANTTFTV	80270	HSD3B7

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
21	RLIQGDQILSV	10207	INADL
22	FLSPPLPSV	593, 641649	BCKDHA, TMEM91
23	YIQEVVQYI	23236	PLCB1
24	FTLGTTVFL	4717	NDUFC1
25	LLVPAHLVAA	11082	ESM1
26	SLMEILYTL	91949	COG7
27	SLSDLLVSL	23596	OPN3
28	FIADLVVGL	2023, 2026, 2027	ENO1, ENO2, ENO3
29	ILLDLEQAL	9820	CUL7
30	QLFYTKIFL	5351	PLOD1
31	VLFGLDPAVIKV	259217	HSPA12A
32	FLAGGIRGSGA	113730	KLHDC7B
33	FIADVVEKI	5654, 94031	HTRA1, HTRA3
34	ELNNQNFYL	11113	CIT
35	VLHSLQTQL	51129	ANGPTL4
36	SLFGKKYIL	2274	FHL2
37	VLAPVILML	8714	ABCC3
38	VLLDTILQL	11077	HSF2BP
39	YLLNLNHLGL	23471	TRAM1
40	YIQEHLLQI	10625	IVNS1ABP
41	GLLKTQLQKL	25932	CLIC4
42	VILDTGTIQL	9027	NAT8
43	YLKDELDEL	23255	SOGA2
44	ALFSFVTAL	80727	TTYH3
45	ALLGIPLTL	3777, 60598	KCNK3, KCNK15
46	GLSEVLVQI	57553	MICAL3
47	TLAEVRAVQEI	56950	SMYD2
48	VVASNIMEV	5209	PFKFB3

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
49	VLIVEVPGV	111	ADCY5
50	SLSDHIVLL	3675	ITGA3
51	NLWPMITL	3675	ITGA3
52	SILDAVQRV	137902	PXDNL
53	FLLEIRQTL	23161	SNX13
54	ALVAKGLVQA	10327	AKR1A1
55	YLALILPVL	9122	SLC16A4
56	ILMDFSNSM	3691	ITGB4
57	SLQKEILYL	55102	ATG2B
58	FLVDFEQSHL	1573	CYP2J2
59	SLKNNVSV	7045	TGFB1
60	ILWKDIEYV	143425	SYT9
61	SLMGILLRI	22900	CARD8
62	VLAGPAFLVQL	55244	SLC47A1
63	GLIEDHFDVTV	51752	ERAP1
64	LLAASVALA	4885	NPTX2
65	IYGGSVTGA	7167, 729708	TPI1, TPI1P1
66	TLLKTIKV	57545	CC2D2A
67	LLDVLAPLV	80781	COL18A1
68	YVLTQPPSV	28796, 28815, 28831, 3537, 3538	IGLV3-21, IGLV2-14, IGLJ3, IGLC1, IGLC2
69	ILADLLPSL	25979	DHRS7B
70	SLTALRLLL	9920	KBTBD11
71	ALDGHLYAV	9920	KBTBD11
72	YSLEKVFGI	10916	MAGED2
73	GLDGIPFTV	7205	TRIP6
74	GLFHKQVTV	23037	PDZD2
75	FLIKSINLV	143879	KBTBD3

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
76	VLADDHLIEV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2, PDZK1, PDZK1P1
77	SLIKHKIML	523	ATP6V1A
78	ALLDTVVQA	8911, 8912	CACNA1I, CACNA1H
79	ALADIVWRA	84182	FAM188B
80	KLASMLETL	112464	PRKCDBP
81	SLLPALPKL	4036	LRP2
82	SLLQATDFMSL	7070	THY1
83	IQWSIVPEV	23151	GRAMD4
84	YLMDEGAHL	7358	UGDH
85	FVMSEIRTV	114991	ZNF618
86	GLLQGKLALL	4835	NQO2
87	LADGVQKV	8542	APOL1
88	TLAELHISL	84166	NLRC5
89	SLLLAVTEV	3714	JAG2
90	FTLEKNFVI	1292	COL6A2
91	MLLSSLVSL	79001	VKORC1
92	FLFRDILEL	29102	DROSHA

Tabla 2: Péptidos adicionales de acuerdo con la presente invención sin asociación conocida al cáncer previa

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
93	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
94	ILHHKVYDL	1528	CYB5A
95	KLTDVGIATL	115701	ALPK2
96	TLAETLVNL	283372, 283373	ANKRD52
97	TLISELVQA	9820	CUL7
98	KIPPVSPSI	57561	ARRDC3

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
99	GLAPHLEQI	79711	IPO4
100	KLNVAPLAV	653784, 80097	MZT2A, MZT2B
101	HIYDKAFITV	2321	FLT1
102	LLFDVHTTL	65250	C5orf42
103	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
104	ALFEGVVRQI	6236	RRAD
105	ALADLDELLIRA	3339	HSPG2
106	VLMDLKALL	51428	DDX41
107	VLMDLKALLL	51428	DDX41
108	VLISVLQAI	26999	CYFIP2
109	YLWSRVEKL	120892	LRRK2
110	LLDLHSYLL	10299	MARCH6
111	TLLETEMLL	80817	CEP44
112	LLFDHLEPIEL	25780	RASGRP3
113	SLFDWNVKL	134111	UBE2QL1
114	ALAVNISAA	908	CCT6A

Tabla 3: Péptidos útiles para por ejemplo terapias contra el cáncer personalizadas

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
115	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
116	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
117	VLFGELPAL	8701	DNAH11
118	FLNAIETAL	8701	DNAH11
119	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
120	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
121	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
122	SLDPSSPQV	9514	GAL3ST1

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
123	YVDPVITSI	4233	MET
124	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
125	KLDPTKTTL	10397	NDRG1
126	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
127	VLAPLFVYL	2535, 8321, 8324	FZD2, FZD1, FZD7
128	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
129	VLAPRVLRA	5954	RCN1
130	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
131	VMAGDIYSV	123	PLIN2
132	SVASTITGV	123	PLIN2
133	QLIDYERQL	11072	DUSP14
134	VADKIHSV	11072	DUSP14
135	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
136	YQDPHSTAV	1956	EGFR
137	TLVAIVGV	60681	FKBP10
138	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y
139	ILNVDGLIGV	47	ACLY
140	SLANNVTSV	131566	DCBLD2
141	LLVDDSFLLTV	253982	ASPHD1
142	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
143	ALFVRLLALA	7045	TGFB1
144	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
145	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
146	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1
147	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
148	KLLTEVHAA	101	ADAM8
149	SILTIEDGIFEV	100287551, 3306,	HSPA8P8, HSPA2,

SEQ ID No	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
		3312	HSPA8
150	TLMPNINKL	5169	ENPP3
151	YMYEGPAPRI	5169	ENPP3

La presente invención adicionalmente se relaciona de manera general con los péptidos de acuerdo con la presente invención para usar en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon o rectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, y cáncer de esófago.

Particularmente se prefieren los péptidos – solos o en combinación - de acuerdo con la presente invención que se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114. Se prefieren aún más los péptidos – solos o en combinación - que se eligen del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 63 (véase la Tabla 1), y sus usos en la inmunoterapia de RCC, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon o rectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemias, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, y cáncer de esófago, y preferiblemente RCC.

Como se muestra en la siguiente Tabla 4A, muchos de los péptidos de acuerdo con la presente invención también se encuentran en otros tipos de tumor y pueden, por lo tanto, ser usados también en la inmunoterapia de otras indicaciones. También referirse a la Figura 1E y el Ejemplo 1.

Tabla 4A: Péptidos de acuerdo con la presente invención y sus usos específicos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades de cáncer. La Tabla muestra para los péptidos seleccionados en cuales tipos de tumores adicionales se encuentran y si se sobre presentan en más del 5% de las muestras de tumor medidas, o se presentan en más del 5% de las muestras tumorales medidas con una relación de media geométrica de tejidos tumorales vs normales que es mayor que 3. La sobre

presentación se define como una presentación mayor que la muestra tumoral en comparación con la muestra normal con la mayor presentación.

SEQ ID No	Secuencia	Otros órganos/enfermedades relevantes
1	ALIVSLPYL	Hígado
2	ILWREVVT	Ovario
5	YLYPNLTRL	Hígado
8	GLASFKSFL	Páncreas
12	ALDPNGNQLI	Ovario
14	ALLTETIFL	Leucocitos
15	ILIKHLVKV	Hígado
16	FMPEELPQL	Páncreas, Mamas, Ovario
21	RLIQGDQILSV	Pulmón, Colon, Recto, Hígado, Ovario
23	YIQEVVQYI	Hígado
24	FTLGTTVFL	Hígado, Próstata, Leucocitos, Esófago
26	SLMEILYTL	Colon, Recto, Páncreas, Próstata, Ovario
27	SLSDLLVSL	Pulmón, Hígado, Páncreas, Leucocitos
28	FIADLVVGL	Melanoma
29	ILLDLEQAL	Pulmón, Páncreas, Próstata, Mamas, Ovario
30	QLFYTKIFL	Pulmón, Colon, Recto, Ovario
31	VLFGLDPAVIKV	Cerebro, Ovario
32	FLAGGIRGSGA	Estómago
33	FIADVVEKI	Pulmón, Leucocitos, Ovario
34	ELNNQNFYL	Melanoma, Esófago
36	SLFGKKYIL	Colon, Recto
37	VLAPVILML	Pulmón, Colon, Recto, Páncreas, Ovario
38	VLLDTILQL	Cerebro, Hígado, Páncreas, Melanoma, Ovario
39	YLLNLNHLGL	Pulmón, Hígado, Leucocitos
44	ALFSFVTAL	Pulmón, Melanoma, Ovario
45	ALLGIPLTL	Próstata, Ovario, Esófago

SEQ ID No	Secuencia	Otros órganos/enfermedades relevantes
46	GLSEVLVQI	Colon, Recto
47	TLAEVRAVQEI	Hígado, Melanoma
49	VLIVEVPGV	Ovario
50	SLSDHIVLL	Pulmón
51	NLWPMILTL	Pulmón, Páncreas, Esófago
52	SILDAVQRV	Pulmón, Cerebro, Páncreas, Ovario
54	ALVAKGLVQA	Melanoma, Ovario
55	YLALILPVL	Melanoma
56	ILMDFSNSM	Páncreas
59	SLKNNVSV	Páncreas, Ovario, Esófago
61	SLMGILLRI	Leucocitos
63	GLIEDHFDVTV	Pulmón, Colon, Recto, Próstata, Leucocitos, Melanoma, Ovario
65	IYGGSVTGA	Mamas
66	TLLKTIKIV	Cerebro
67	LLDVLAPLV	Pulmón, Estómago, Hígado, Páncreas, Mamas, Esófago
68	YVLTQPPSV	Pulmón, Páncreas, Leucocitos, Esófago
69	ILADLLPSL	Pulmón, Cerebro, Páncreas, Mamas, Ovario
72	YSLEKVFGI	Hígado
73	GLDGIPFTV	Cerebro, Páncreas, Mamas, Melanoma
78	ALLDTVVQA	Hígado, Próstata
79	ALADIVWRA	Pulmón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Próstata, Ovario, Esófago
82	SLLQATDFMSL	Colon, Recto, Páncreas, Esófago
84	YLMDEGAHL	Hígado
85	FVMSEIRTV	Hígado
86	GLLQGKLALL	Hígado, Melanoma

SEQ ID No	Secuencia	Otros órganos/enfermedades relevantes
87	LADGVQKV	Mamas, Melanoma
88	TLAELHISL	Ovario
90	FTLEKNFVI	Próstata
91	MLLSSLVSL	Pulmón, Hígado
93	GVMAGDIYSV	Pulmón, Colon, Recto, Hígado, Esófago
94	ILHHKVYDL	Hígado
96	TLAETLVNL	Pulmón, Estómago, Colon, Recto, Páncreas, Próstata, Mamas, Ovario, Esófago
97	TLISELVQA	Pulmón, Colon, Recto, Páncreas, Próstata, Mamas, Melanoma, Ovario, Esófago
98	KIPPVSPSI	Pulmón, Hígado, Mamas
99	GLAPHLEQI	Hígado, Ovario
100	KLNVAPLAV	Pulmón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Melanoma, Ovario
101	HIYDKAFITV	Hígado, Ovario
102	LLFDVHTTL	Pulmón, Cerebro
103	KLQDGLLHI	Cerebro, Colon, Recto, Hígado
104	ALFEGVVRQI	Hígado, Melanoma, Esófago
105	ALADLDELLIRA	Páncreas, Melanoma
107	VLMDLKALLL	Próstata, Leucocitos, Ovario
108	VLISVLQAI	Leucocitos
109	YLWSRVEKL	Páncreas, Ovario
110	LLDLHSYLL	Estómago, Leucocitos
111	TLLETEMLL	Páncreas, Mamas
112	LLFDHLEPIEL	Leucocitos
113	SLFDWNVKL	Hígado, Próstata
114	ALAVNISAA	Pulmón, Cerebro, Hígado, Páncreas, Esófago
115	LLDPKTIFL	Colon, Recto, Hígado

SEQ ID No	Secuencia	Otros órganos/enfermedades relevantes
116	GLVDIMVHL	Ovario
117	VLFGELPAL	Pulmón, Páncreas, Mamas, Ovario
119	RLHDENILL	Pulmón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Próstata, Ovario, Esófago
121	ALLRTVVSV	Pulmón, Hígado, Páncreas, Mamas, Ovario
122	SLDPSSPQV	Hígado
123	YVDPVITSI	Pulmón
124	ILSPLSVAL	Hígado, Páncreas
125	KLDPTKTTL	Próstata
126	KIQEILTQV	Pulmón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Leucocitos, Ovario, Esófago
127	VLAPLFVYL	Pulmón, Páncreas, Mamas, Melanoma
128	YLEEDVYQL	Pulmón, Páncreas
129	VLAPRVLRA	Pulmón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Ovario
130	ALPTVLVGV	Pulmón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Melanoma, Esófago
131	VMAGDIYSV	Pulmón, Hígado, Páncreas, Esófago
132	SVASTITGV	Hígado, Mamas
133	QLIDYERQL	Pulmón, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Esófago
134	VADKIHSV	Estómago, Páncreas, Esófago
135	VVDEGPTGV	Pulmón, Cerebro, Estómago, Hígado, Páncreas, Leucocitos, Mamas, Ovario, Esófago
136	YQDPHSTAV	Cerebro, Hígado
137	TLVAIVGV	Pulmón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Próstata, Mamas, Ovario

SEQ ID No	Secuencia	Otros órganos/enfermedades relevantes
138	SLDTLMTYV	Pulmón, Cerebro, Colon, Recto, Páncreas, Próstata, Leucocitos, Esófago
139	ILNVDGLIGV	Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Próstata
140	SLANNVTSV	Pulmón, Cerebro, Páncreas, Melanoma, Ovario, Esófago
141	LLVDDSFLHTV	Cerebro, Hígado, Páncreas, Melanoma, Ovario, Esófago
142	SVDVSPPKV	Pulmón, Páncreas, Melanoma, Esófago
143	ALFVRLLALA	Pulmón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Melanoma, Esófago
144	RLLDVLAPLV	Hígado
145	SLHFLILYV	Pulmón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Melanoma, Ovario
146	KLIDLSQVMYL	Pulmón, Colon, Recto, Páncreas, Ovario
147	ALADKELLPSV	Pulmón, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Melanoma, Ovario
148	KLLTEVHAA	Pulmón, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Mamas, Ovario, Esófago
149	SILTIEDGIFEV	Pulmón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Próstata, Leucocitos, Mamas, Melanoma, Ovario
150	TLMPNINKL	Hígado

Tabla 4B: Péptidos de acuerdo con la presente invención y sus usos específicos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades de cáncer. La Tabla muestra, como en la Tabla 4A, para los péptidos seleccionados en cuales otros tipos de tumor se encuentran mostrando una sobre presentación (que incluye presentación específica) de más del 5% de las muestras tumorales medidas, o presentación en más del 5% de las muestras tumorales medidas con una relación de media geométrica de

tejidos tumorales vs normales siendo mayor que 3. La sobre presentación se define como una presentación mayor que la muestra tumoral en comparación con la muestra normal con la mayor presentación. Los tejidos normales contra los cuales se ensaya la sobre presentación fueron: tejido adiposo, glándula adrenal, células sanguíneas, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebro, cartílago, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, nódulo linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroides, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroides, tráquea, uréter, vejiga urinaria.

SEQ No	Secuencia	Entidades adicionales
2	ILWREVVTL	Melanoma, NHL
4	FLSQDIITV	Cáncer uterino
6	VLFEISKTV	AML
8	GLASFKSFL	Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
10	KLLQNNYGL	BRCA, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
12	ALDPSTGNQLI	Cáncer de cerebro
13	KIMAQILTV	CLL, NHL
14	ALLTETIFL	NHL
15	ILIKHLVKV	Cáncer uterino, NHL
17	ILAQQVHAL	Cáncer uterino
18	YVLDLAAKV	SCLC, CLL, BRCA, Melanoma, Cáncer uterino, NHL
20	AVANTTFTV	Cáncer de esófago, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino
21	RLIQGDQILSV	SCLC, BRCA, Cáncer de esófago, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, OC
24	FTLGTTVFL	Melanoma, Cáncer uterino, NHL
26	SLMEILYTL	Melanoma, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, AML, OC, SCLC

27	SLSDLLVSL	CRC, Melanoma, Cáncer uterino, AML, NHL
28	FIADLVVGL	SCLC, CLL, AML, NHL
29	ILLDLEQAL	Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, AML, NHL, OC
30	QLFYTKIFL	Melanoma, Cáncer de esófago, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
33	FIADVVEKI	SCLC, BRCA, Cáncer de esófago
34	ELNNQNFYL	CRC, Cáncer de la vejiga urinaria, AML, NHL
36	SLFGKKYIL	Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
38	VLLDTILQL	NSCLC, SCLC, CLL, BRCA, Cáncer de esófago, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, AML, NHL, OC
39	YLLNLNHLGL	NHL
40	YIQEHLLQI	Melanoma
43	YLKDELDEL	Cáncer de esófago, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, NHL
45	ALLGIPLTL	BRCA, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, OC
46	GLSEVLVQI	SCLC, HCC, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, NHL
48	VVASNIMEV	BRCA, Melanoma
49	VLIVEVPGV	Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, OC
50	SLSDHIVLL	PC, Melanoma, Cáncer de esófago, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
51	NLWPMILTL	Melanoma, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, Cáncer de esófago

52	SILDAVQRV	SCLC, BRCA, Melanoma, Cáncer uterino
54	ALVAKGLVQA	NHL
55	YLALILPVL	CLL
56	ILMDFSNSM	Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
57	SLQKEILYL	Melanoma
59	SLKNNVSV	Melanoma, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
61	SLMGILLRI	BRCA
62	VLGPAFLVQL	Cáncer uterino
63	GLIEDHFDVTV	SCLC
64	LLAASVALA	Cáncer de cerebro, AML
65	IYGGSVTGA	CLL, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino
66	TLLKTIKIV	Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria
67	LLDVLAPLV	CRC, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
68	YVLTQPPSV	BRCA
69	ILADLLPSL	SCLC, Melanoma, Cáncer de esófago, Cáncer uterino, AML, NHL
72	YSLEKVFGI	Cáncer de cerebro, GC, CRC, PrC, BRCA, Melanoma, OC, Cáncer de la vejiga urinaria, AML, PC
73	GLDGIPFTV	GC, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, AML
75	FLIKSINLV	CLL, Melanoma, AML
76	VLADDHLIEV	HCC, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
77	SLIKHKIML	CRC, Melanoma, Cáncer uterino
78	ALLDTVVQA	BRCA
79	ALADIVWRA	SCLC, BRCA, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto

		biliar, Cáncer de esófago, OC
80	KLASMLETL	Melanoma
81	SLLPALPKL	BRCA
82	SLLQATDFMSL	NSCLC, Cáncer de cerebro, BRCA, Melanoma, Cáncer uterino, NHL, PC
83	IQWSIVPEV	CLL, Melanoma, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, AML, NHL
84	YLMDEGAHL	Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
85	FVMSEIRTV	Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
86	GLLQGKLALL	Cáncer uterino, NHL
88	TLAELHISL	CLL, Cáncer de esófago
89	SLLLAVTEV	SCLC, BRCA, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria
90	FTLEKNFVI	CRC, BRCA, PC
91	MLLSSLVSL	SCLC, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar
92	FLFRDILEL	Melanoma, AML
93	GVMAGDIYSV	Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, PC
95	KLTDVGIATL	Melanoma, NHL
96	TLAETLVNL	SCLC, HCC, CLL, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, AML, NHL
97	TLISELVQA	SCLC, GC, HCC, CLL, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, NHL
98	KIPPVSPSI	Cáncer uterino, NHL
99	GLAPHLEQI	BRCA, Melanoma, AML, NHL
100	KLNVAPLAV	CLL, BRCA, Cáncer uterino, AML, NHL, OC
101	HIYDKAFITV	SCLC, BRCA
102	LLFDVHTTL	SCLC, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer

		uterino, AML
103	KLQDGLLHI	SCLC, PC, Melanoma, OC, NHL
104	ALFEGVVRQI	Cáncer de la vejiga urinaria
105	ALADLDELLIRA	BRCA
106	VLMDLKALL	AML
107	VLMDLKALLL	AML
108	VLISVLQAI	BRCA, AML, NHL
109	YLWSRVEKL	CLL, NHL
110	LLDLHSYLL	Cáncer uterino
111	TLLETEMLL	Cáncer de la vejiga urinaria
112	LLFDHLEPIEL	BRCA, NHL
113	SLFDWNVKL	SCLC, BRCA, Cáncer de esófago, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, AML, NHL
114	ALAVNISAA	GC, CRC, CLL, BRCA, Melanoma, Cáncer de la vejiga urinaria, Cáncer uterino, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer del ducto biliar, AML, NHL, PC

NSCLC= cáncer de pulmón a células no pequeñas, SCLC= cáncer de pulmón a células pequeñas, RCC= cáncer de riñón, CRC= cáncer de colon o recto, GC= cáncer de estómago, HCC= cáncer de hígado, PC= cáncer pancreático, PrC= cáncer de próstata, BRCA= cáncer de mama, MCC= carcinoma de células de Merkel, OC= cáncer de ovario, NHL= linfoma no Hodgkin, AML= leucemia mieloide aguda, CLL= leucemia linfocítica crónica.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No. 21, 27, 29, 30, 33, 37, 39, 44, 50, 51, 52, 63, 67, 68, 69, 79, 91, 93, 96, 97, 98, 100, 102, 114, 117, 119, 121, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 165, 137, 138, 140, 142, 143, 145, 146, 147, 148 y 149, para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer de pulmón.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de

por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 31, 38, 52, 66, 69, 73, 79, 100, 102, 103, 114, 119, 126, 129, 130, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 145 y 149 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer de cerebro.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 32, 67, 96, 110, 126, 130, 134, 135, 137, 143 y 148 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer gástrico.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 21, 26, 30, 36, 37, 46, 63, 79, 82, 93, 96, 97, 100, 103, 115, 119, 126, 129, 130, 133, 137, 138, 139, 143, 145, 146 147, 148 y 149 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer colorrectal.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 1, 5, 15, 21, 23, 24, 27, 38, 39, 47, 67, 72, 78, 79, 84, 85, 86, 91, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 113, 114, 115, 119, 121, 122, 124, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 139, 141, 143, 144, 145, 147, 148, 149 y 150 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento de cáncer hepático.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 8, 16, 26, 27, 29, 37, 38, 51, 52, 56, 59, 67, 68, 69, 73, 79, 82, 96, 97, 100, 105, 109, 111, 114, 117, 119, 121, 124, 126, 127, 128, 129, 131, 133, 134, 135, 137, 138, 140, 141, 142, 146, 147, 148 y 149 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer pancreático.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 24, 26, 29, 45, 63, 78, 79, 90, 96, 97, 107, 113, 119, 125, 137, 138, 139 y 149 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer de próstata.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 14, 24, 27, 33, 39, 61, 63, 68, 107, 108, 110, 112, 126, 135, 138 y 149 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento de leucemias.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 16, 29, 65, 67, 69, 73, 87, 96, 97, 98, 111, 117, 121, 127, 132, 135, 137, 148 y 149 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer de mama.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 28, 34, 38, 44, 47, 54, 55, 63, 73, 86, 87, 97, 100, 104, 105, 127, 130, 140, 141, 142, 143, 145, 147 y 149 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento de melanoma.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 2, 12, 16, 21, 26, 29, 30, 31, 33, 37, 38, 44, 45, 49, 52, 54, 59, 63, 69, 79, 88, 96, 97, 99, 100, 101, 107, 109, 116, 117, 119, 121, 126, 129, 135, 137, 140, 141, 145, 146, 147, 148 y 149 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer de ovario.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la presente invención de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No 24, 34, 45, 51, 59, 67, 68, 79, 82, 93, 96, 97, 104, 114, 119, 126, 130, 131, 133, 134, 135, 138, 140, 141, 142, 143 y 148 para el – en una forma de realización preferida combinado - tratamiento del cáncer de esófago.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de los péptidos de acuerdo con la presente invención para el - preferiblemente combinado - tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada del grupo de RCC, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemias, cáncer de mama, melanoma, cáncer de

ovario, y cáncer de esófago, y preferiblemente RCC.

Preferiblemente, la presente invención se relaciona con el uso de los péptidos de acuerdo con la presente invención de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y/o 15 para el - preferiblemente combinado - tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada del grupo de RCC, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemias, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, y cáncer de esófago, y preferiblemente RCC.

La presente invención adicionalmente se relaciona con péptidos de acuerdo con la presente invención que tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) clase-I o – en una forma elongada, tal como una variante de longitud de - MHC de clase -II.

La presente invención además se relaciona con los péptidos de acuerdo con la presente invención en donde los mencionados péptidos (cada uno) consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114.

La presente invención además se relaciona con los péptidos de acuerdo con la presente invención, en donde el mencionado péptido está modificado y/o incluye enlaces no peptídicos.

La presente invención además se relaciona con los péptidos de acuerdo con la presente invención, en donde el mencionado péptido es parte de una proteína de fusión, en particular fusionada a los aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena no variable asociada al antígeno HLA-DR (II), o fusionada a (o en la secuencia de) un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.

La presente invención además se relaciona con un ácido nucleico, que codifica para los péptidos de acuerdo con la presente invención. La presente invención además se relaciona con el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que es ADN, ADNc, ANP, ARN o combinaciones de los mismos.

La presente invención además se relaciona con un vector de expresión con capacidad de expresar y/o expresar un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La presente invención además se relaciona con un péptido de acuerdo con la presente invención, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión de acuerdo con la presente invención para usar en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en particular en el tratamiento de cáncer.

La presente invención además se relaciona con anticuerpos que son específicos por los péptidos de acuerdo con la presente invención o complejos de los mencionados péptidos de acuerdo con la presente invención con MHC, y métodos para fabricarlos.

La presente invención además se relaciona con receptores de células T (TCRs), en particular TCR soluble (TCR solubles) y TCRs clonados diseñados en células T autólogas o alogénicas, y métodos para fabricarlos, así como células NK u otras células que portan el mencionado TCR o que reaccionan de manera cruzada con los mencionados TCRs.

Los anticuerpos y TCRs son formas de realización adicionales del uso inmunoterapéutico de los péptidos de acuerdo con SEQ ID 1 a SEQ ID 151 de acuerdo con la invención presente.

La presente invención además se relaciona con una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión como se describió precedentemente. La presente invención además se relaciona con la célula huésped de acuerdo con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente es una célula dendrítica.

La presente invención además se relaciona con un método para producir un péptido de acuerdo con la presente invención, en donde dicho método comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la presente invención, y aislar el péptido de la mencionada célula huésped o su medio de cultivo.

La presente invención además se relaciona con el mencionado método de acuerdo con la presente invención, en donde el antígeno se carga en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o célula presentadora de antígeno artificial poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención además se relaciona con el método de acuerdo con la

presente invención, en donde la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión con capacidad de expresar o que expresa el mencionado péptido que contiene la SEQ ID No. 1 a SEQ ID No.: 114, preferiblemente que contiene la SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 63, o una secuencia de aminoácidos variante.

La presente invención además se relaciona con células T activadas, producidas por el método de acuerdo con la presente invención, en donde la mencionada célula T reconoce selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención.

La presente invención además se relaciona con un método para matar células blanco en un paciente cuyas células blanco expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de células T como las producidas de acuerdo con la presente invención.

La presente invención además se relaciona con el uso de cualquier péptido como los descritos, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención, el linfocito T activado, el receptor de células T o el anticuerpo u otra molécula de unión a péptido- y/o péptido-MHC de acuerdo con la presente invención como un medicamento o en la fabricación de un medicamento. Preferiblemente, el mencionado medicamento es activo contra el cáncer.

Preferiblemente, el mencionado medicamento es para una terapia celular, una vacuna o una proteína en base a un TCR soluble o anticuerpo.

La presente invención además se relaciona con un uso de acuerdo con la presente invención, en donde dichas células del cáncer son células de RCC, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon o rectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemias, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, y cáncer de esófago, y preferiblemente RCC.

La presente invención además se relaciona con biomarcadores basados en los péptidos de acuerdo con la presente invención, llamados en la presente “blancos” que pueden usarse en el diagnóstico del cáncer, preferiblemente RCC. El marcador puede ser

la sobre presentación del o los péptidos en sí mismos, o la sobreexpresión de o los correspondientes genes. Los marcadores también pueden usarse para predecir la probabilidad de éxito de un tratamiento, preferiblemente una inmunoterapia, y más preferentemente una inmunoterapia dirigida al mismo blanco que es identificado por el biomarcador. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo TCR soluble para teñir secciones del tumor para detectar la presencia de un péptido de interés en complejo con MHC.

Opcionalmente el anticuerpo porta una función efectora adicional tal como un dominio estimulante inmunológico o toxina.

La presente invención también se relaciona con el uso de estos blancos novedosos en el contexto del tratamiento del cáncer.

El ABCC3 se asocia con carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario, cáncer rectal, osteosarcoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón a células no pequeñas, glioblastoma multiforme y adenocarcinoma del ducto pancreático (Mohelnikova-Duchonova y col., 2013; Molina-Pinelo y col., 2014; Goode y col., 2014; Liu y col., 2014c; Yu y col., 2014; Sedlakova y col., 2015; Zuniga-Garcia y col., 2015; Wang y col., 2014c).

El ACLY se expresa de manera aberrante en diferentes tumores, tales como cáncer de mamas, hígado, colon, pulmón y de próstata, y se correlaciona en forma inversa con el estadio y diferenciación del tumor (Zu y col., 2012).

La sobreexpresión de ADAM8 en el cáncer pancreático se asocia con migración e invasividad aumentadas de células de adenocarcinoma del ducto pancreático (Schlomann y col., 2015). El ADAM8 está involucrado en la migración e invasión de las células tumorales en cáncer de pulmón, carcinoma de células renales y cánceres de cerebro (Mochizuki y Okada, 2007).

La hipermetilación del ADCY5 y la expresión reducida del ARNm se produce en leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica y adenocarcinoma de pulmón (Kuang y col., 2008; Tong y col., 2010; Sato y col., 2013a).

El AHNK2 es un elemento importante de la vía de secreción no clásica del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1), un factor involucrado en el crecimiento e invasión del tumor (Kirov y col., 2015).

Se mostró que la expresión de AIFM2 estaba disminuida en la mayoría de los

tumores humanos (Wu y col., 2004; Mei y col., 2006). El AIFM2 se identificó como uno de los nueve genes que estaban asociados con la eliminación funcional de la tumorigenicidad en líneas celulares de cáncer de ovario (Notaridou y col., 2011).

Se mostró que AKR1A1 aumenta su expresión en cáncer de mama y se asocia con cáncer de pulmón y cáncer de laringe (Penning, 2014; Hlavac y col., 2014; Kim y col., 2012).

La expresión de ALPK2 está disminuida en el adenoma colorrectal y cumple un posible rol en la transición de la cripta colónica normal a adenoma (Yoshida y col., 2012). El ALPK2 muestra una fuerte asociación entre la pérdida del número de copias y la baja expresión en cáncer gástrico (Junnla y col., 2010).

Se mostró que ANGPTL4 aumenta su expresión en cáncer de mama, cáncer de ovario seroso y se asocia con glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas orales y cáncer de pulmón (Ferguson y col., 2013; Tanaka y col., 2015; Ng y col., 2014; Garner y col., 2015; Schumann y col., 2015; Johnson y col., 2015).

La expresión de APOL1 está disminuida en tejido de carcinoma de células renales y líneas celulares (Hu y col., 2012).

El ARRDC3 se asocia con cáncer de mama y cáncer de próstata (Wang y col., 2014a; Huang y col., 2012a).

Las mutaciones con cambio de marco de ATG2B son comunes en carcinomas gástricos y de colon con alta inestabilidad de los microsatélites (Kang y col., 2009).

Se mostró que ATP11A aumenta su expresión en cáncer colorrectal y se asocia con leucemia linfoblástica y se sugiere como un biomarcador de metástasis en cáncer colorrectal (Miyoshi y col., 2010; Zhang y col., 2005).

Se mostró que ATP2A1 aumenta su expresión en caquexia del cáncer (Fontes-Oliveira y col., 2013).

El ATP2A2 se asocia con cáncer de piel, cáncer de colon y cáncer de pulmón (Korosec y col., 2006; Hovnanian, 2007).

El CACNA1H se asocia con adenomas productores de aldosterona, cáncer de próstata y cáncer de mama (Felizola y col., 2014; Asaga y col., 2006; Gackiere y col., 2013).

El CACNA1I se asocia con cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata (Basson y col., 2015).

El CARD8 está muy expresado en diferentes líneas celulares de cáncer que incluyen cáncer de ovario, de mamas y de pulmón así como en tejidos derivados de pacientes con carcinoma colorrectal, cáncer gástrico o de mama (Pathan y col., 2001; Yamamoto y col., 2005).

El CCT6A se asocia con tumores de la línea de células germinales de testículo y melanomas malignos (Tanic y col., 2006; Alagaratnam y col., 2011).

El CIT está frecuentemente aumentado en el carcinoma hepatocelular (HCC) en comparación con los tejidos no tumorales adyacentes. La eliminación génica de CIT por ARNi suprime la tumorigenicidad de las células HCC *in vivo* (Fu y col., 2011).

La disminución de CLIC4 en células tumorales y el aumento en el estroma tumoral es común en muchos cánceres humanos incluyendo cáncer renal, de ovario, de mamas, de pulmón y cutáneo, y marca la progresión maligna (Suh y col., 2007a; Okudela y col., 2014; Suh y col., 2007b).

Se informó la expresión diferencial de COL18A1 para el cáncer de vejiga, tumores rabdoides y carcinoma de ovario y se mostró que polimorfismos específicos en el gen aumentan el riesgo de cáncer de mamas esporádico (Fang y col., 2013; Gadd y col., 2010; Lourenco y col., 2006; Peters y col., 2005).

El COL6A2 se asocia con cáncer cervical, supervivencia total pobre en cáncer de ovario seroso de alto grado, leucemia linfoblástica aguda de precursores B, carcinoma hepatocelular, tumores de cerebro primarios y metastásicos, carcinoma de células escamosas del pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y se describió como una metilación potencial de ADN para el cáncer cervical (Cheon y col., 2014; Chen y col., 2014c; Vachani y col., 2007; Liu y col., 2010b; Seong y col., 2012; Hogan y col., 2011).

El CUL7 se asocia con cáncer pancreático y carcinoma hepatocelular (Wang y col., 2014b; Paradis y col., 2013).

La expresión de CYB5A está disminuida en el carcinoma hepatocelular (Khan y col., 2013a). El CYB5A es un factor pronóstico para el adenocarcinoma del ducto

pancreático que ejerce su función supresora de tumor mediante la inducción de autofagia y la modulación de TRAF6 (Giovannetti y col., 2014). El CYB5A codifica para una enzima que detoxifica moléculas carcinogénicas y es un factor pronóstico para el cáncer pancreático (Blanke y col., 2014; Giovannetti y col., 2014).

La expresión de CYFIP2 se incrementa en nódulo linfáticos formados recientemente en el cáncer de mama (Gantsev y col., 2013). La expresión de CYFIP2 está reducida en las muestras de tumor gástrico humano, en comparación con tejidos control (Cheng y col., 2013). El CYFIP2 es uno de los diferentes genes relacionados con la apoptosis metilados en la leucemia linfocítica crónica (Halldorsdottir y col., 2012).

El CYP2J2 es una enzima, que se ha mostrado que está sobreexpresada en una variedad de cánceres humanos, incluyendo cáncer esofágico, de pulmón, de mamas, de estómago, de hígado y de colon. El CYP2J2 aumenta la proliferación e inhibe la apoptosis de las células de carcinoma al promover la fosforilación de EGFR y la activación de la señalización mediada por PI3K y MAPK y además metaboliza los inhibidores de tirosina quinasa, confiriendo de esta manera resistencia a los agentes anticancerígenos (Jiang y col., 2005; Narjoz y col., 2014).

El DCBLD2 aumenta su expresión en glioblastomas y cánceres de cuello y cabeza (HNCs) y se requiere para la tumorigénesis estimulada por EGFR (Feng y col., 2014). Adicionalmente, el DCBLD2 aumenta su expresión en sublíneas de cáncer de pulmón altamente metastásico y muestras de tejido (Koshikawa y col., 2002). Por el contrario, la expresión de DCBLD2 se silencia por hipermetilación de su promotor en cáncer gástrico (Kim y col., 2008).

El DDX41 se asocia con leucemia mieloide aguda (Antony-Debre y Steidl, 2015).

DROSHA, una de las dos enzimas críticas en la biosíntesis de microARN, está sobreexpresada en un número de cánceres que incluyen tumores gastrointestinales, cáncer de mama y cáncer cervical y parece potenciar la proliferación, formación de colonias y migración de células tumorales (Avery-Kiejda y col., 2014; Havens y col., 2014; Zhou y col., 2013).

Los polimorfismos de nucleótido simple en el gen DUSP14 están asociados con el riesgo de melanoma alterado (Yang y col., 2014a; Liu y col., 2013).

Se mostró que EGFR aumenta su expresión en cáncer de mama y carcinoma adenoide de glándula salival y se asocia con cáncer de pulmón a células no pequeñas, carcinoma hepatocelular y cáncer colorrectal (Dienstmann y col., 2015; Wang y col., 2015b; Steinway y col., 2015; Xiao y col., 2015; Inoue y col., 2015).

Se mostró que la expresión de EGLN3 aumenta su expresión en cáncer de pulmón a células no pequeñas y carcinomas de células renales. Adicionalmente, el EGLN3 se asocia con carcinoma de células renales de células claras y cáncer colorrectal (Tanaka y col., 2014; Yang y col., 2014d; Toth y col., 2014; Chu y col., 2014).

Se mostró que la expresión de ENO1 aumenta su expresión en cáncer de pulmón a células no pequeñas. Adicionalmente, el ENO1 se asocia con carcinoma endometrial, adenocarcinoma del ducto pancreático, glioblastoma y carcinoma nasofaríngeo (Yang y col., 2014b; Naryzhnyi y col., 2014; Principe y col., 2015; Fu y col., 2015; Zhao y col., 2015a).

El ENO2 se asocia con cáncer de pulmón, carcinoma neuroendócrino sólido, tumores de células granulares y cáncer pancreático (Sigari y col., 2014; Zizi-Sermpetzoglou y col., 2014; Liu y col., 2014a; Bedir y col., 2015; Wang y col., 2013b).

El ENO3 se asocia con linfoma de células B, sarcoma alveolar de partes blandas, rabdomiosarcoma y neuroblastoma (Oka y col., 1989; Mukai y col., 1986; Royds y col., 1985; Ishiguro y col., 1984).

El ENPP3 se asocia con neuroblastoma, cáncer colorrectal en estadio II, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas, leucemia basofílica aguda y carcinoma del ducto biliar (Agesen y col., 2012; Staal-Viliare y col., 2007; Gomez-Villafuertes y col., 2014; Yano y col., 2004; Thiel y col., 2011).

El ERAP1 se asocia con carcinoma cervical, carcinoma de células renales, carcinoma esofágico de células escamosas, melanoma, carcinoma de ovario y neuroblastoma (Mehta y col., 2015; Forloni y col., 2010; Liu y col., 2010a; Kamphausen y col., 2010; Ayshamgul y col., 2011; Stoehr y col., 2013).

Se mostró que la expresión ESM1 está elevada en cáncer gástrico y se asocia con hepatoblastoma, carcinoma nasofaríngeo y cáncer de ovario y puede ser un potencial biomarcador para el cáncer gástrico (Yu y col., 2013; Dong y col., 2014; Lv y col., 2014;

El Behery y col., 2013).

Se mostró que FHL2 aumenta su expresión en leucemia mieloide aguda, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, colon carcinoma, cáncer de mama, adenocarcinoma del ducto pancreático, y melanoma maligno humano y tiene una expresión disminuida en el cáncer de próstata y rhabdomyosarcoma (Kleiber y col., 2007; Westphal y col., 2015; Qian y col., 2010; Zienert y col., 2015).

Se identificó a FKBP10 como un gen novedoso que participa en la adquisición y mantenimiento del fenotipo resistente a Adriamicina en células de leucemia (Sun y col., 2014b). Se ha asociado a FKBP10 con el cáncer colorrectal por su sobreexpresión (Olesen y col., 2005). Por el contrario, la disminución en la expresión de FKBP10 fue característica del carcinoma epitelial de ovarios (Quinn y col., 2013).

El FLT1 se asocia con cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón a células no pequeñas y cáncer pancreático (Awasthi y col., 2015; Heist y col., 2015; Tsourlakis y col., 2015; Zhang y col., 2015).

El FZD1 se asocia con cáncer de esófago, carcinoma de tiroides, sarcoma de útero, cáncer de próstata, carcinoma y adenocarcinoma de células escamosas/adenoesquamosas de la vesícula biliar, cáncer de colon y cáncer de mama (Goksel y col., 2014; Hung y col., 2014; Davidov y col., 2014; Su y col., 2015; Zhang y col., 2012a; Planutis y col., 2013; Devaney y col., 2013; Li y col., 2014a).

Se demostró que el FZD2 aumenta su expresión en cáncer de esófago y que se asocia con tumor estromal gastrointestinal, carcinoma quístico adenoide salival y cáncer colorrectal (Wang y Zheng, 2014; Ding y col., 2015; Prakash y col., 2005; Liu y col., 2014b).

Se demostró que el FZD7 aumenta su expresión en cáncer de ovario y que se asocia con cáncer cervical, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de mama, cáncer gástrico y neurocitoma central (Anastas y col., 2014; Li y col., 2014c; Gonzalez y col., 2014; Song y col., 2014; Deng y col., 2015; Asad y col., 2014; Vasiljevic y col., 2013; Rocken y Warneke, 2012; Dey y col., 2013).

La actividad de GAL3ST1 se incrementa en tejido de carcinoma de células renales (RCC) y en la línea celular de RCC SMKT-R3 (Honke y col., 1996). La expresión de

GAL3ST1 aumenta en células de carcinoma epitelial de ovario versus tejido estromal ovárico normal y células epiteliales ováricas superficiales normales (Liu y col., 2010c).

GALNT2, la N-acetilgalactosaminiltransferasa 2, se demostró que ejerce actividad anti-proliferativa y anti-metastásica a través de la disminución de MMP-2 y TGF- β 1 en células de cáncer gástrico y a través de la inhibición de la actividad del receptor de EGF en carcinoma hepatocelular, en donde frecuentemente disminuye su expresión. Por el contrario, en carcinoma de células escamosas se informó que la sobreexpresión de GALNT2 aumenta el potencial invasivo de las células tumorales mediante la modificación de la O-glicosilación y la actividad del EGFR (Hua y col., 2012; Lin y col., 2014; Wu y col., 2011).

El GRAMD4 aumenta su expresión en líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HCC) y en tejidos de HCC, y la expresión incrementada se correlaciona con las características clinicopatológicas del HCC (Zhang y col., 2013).

El HAVCR1 se describió como un nuevo candidato a biomarcador asociado con carcinoma de células claras ováricas y carcinoma de células renales (Bonventre, 2014; Kobayashi y col., 2015). Se demostró que el HAVCR1 activa el eje IL-6/STAT-3/HIF-1A en líneas celulares derivadas de carcinoma de células claras de células renales y determina la progresión del tumor y la supervivencia del paciente (Cuadros y col., 2014). La expresión constitutiva de HAVCR1 en el riñón se describió como un rasgo potencial de susceptibilidad para desarrollo de carcinoma de células renales a células claras (Cuadros y col., 2013). El HAVCR1 se describió con expresión aumentada en carcinomas de células renales y de células claras ováricas y en cáncer colorrectal (Wang y col., 2013c). El aumento de expresión de HAVCR1 se describió como un biomarcador diagnóstico potencial para cáncer colorrectal y un marcador pronóstico para un mayor intervalo libre de enfermedad después de la cirugía, por lo que también puede estar implicado en la cascada metastásica en cáncer colorrectal (Wang y col., 2013c). Se demostró que el HAVCR1 se asocia con leucemia linfocítica granula grande de células T (Wlodarski y col., 2008).

El HSF2BP codifica para la proteína de unión a HSF2 que se asocia con HSF2 y puede estar implicada en la activación modulante de HSF2 (RefSeq, 2002).

El HSF4 codifica para el factor de transcripción de choque térmico 4, que activa los genes de respuesta a choque térmico bajo condiciones de calor u otros tipos de estrés (RefSeq, 2002). Se demostró que el HSF4 disminuye su expresión en glioblastoma (Mustafa y col., 2010).

Diferentes estudios sugieren un importante rol del HSPA2 en la progresión de enfermedad de cáncer cervical, carcinoma de células renales y cáncer de vejiga. Los polimorfismos dentro del gen están asociados con el desarrollo de cáncer gástrico (Ferrer-Ferrer y col., 2013; Garg y col., 2010a; Garg y col., 2010b; Singh y Suri, 2014).

Se demostró que el HSPA8 se sobreexpresa en carcinoma esofágico de células escamosas y que los altos niveles de expresión de HSPA8 en células de cáncer de esófago *in vitro* contrarresta la apoptosis inducida por estrés oxidativo en estas células. Adicionalmente, el HSPA8 se sobreexpresa en mieloma múltiple y carcinoma de colon y la expresión de HSPA8 inducida por BCR-ABL1 promueve la supervivencia celular en leucemia mieloide crónica (Chatterjee y col., 2013; Dadkhah y col., 2013; Jose-Eneriz y col., 2008; Kubota y col., 2010; Wang y col., 2013a).

El HSPG2 se asocia con melanoma, carcinoma de células escamosas orales, carcinoma de células renales a células claras y tumor de próstata y se demostró la disminución de su expresión en carcinoma hepatocelular y colon tumor (Nikitovic y col., 2014; Warren y col., 2014; Gbormittah y col., 2014; Zaghloul y col., 2015; Kawahara y col., 2014; Suhovskih y col., 2015; 2015; Elewa y col., 2015; Lai y col., 2011).

El HTRA1 se asocia con carcinoma hepatocelular, linfoma de zona marginal esplénica, carcinoma de células escamosas y neuroblastoma y se demostró que disminuye su expresión en cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de vesícula biliar y adenocarcinoma de pulmón (Xu y col., 2014; D'Angelo y col., 2014; Fujinaga y col., 2014; Sahasrabuddhe y col., 2014; Franco y col., 2015; Arribas y col., 2015; Zhao y col., 2015b; Bao y col., 2015).

Se demostró que el HTRA3 aumenta su expresión en carcinoma de células escamosas orales y carcinoma de tiroides y que disminuye su expresión en cáncer de ovario, cáncer de mama, endometrial cancer y cáncer de pulmón, y se asocia con cáncer colorrectal y que puede ser un biomarcador pronóstico potencial para cáncer oral

(Karagiannis y col., 2014; Zhao y col., 2014; Moriya y col., 2015; Narkiewicz y col., 2009; Belefond y col., 2010; Zurawa-Janicka y col., 2012; Yin y col., 2013).

El IGF2BP3 codifica para la proteína de unión a ARNm 3 del factor de crecimiento similar a insulina II, una proteína oncofetal, que reprime la traducción del factor de crecimiento similar a insulina II (RefSeq, 2002). Estudios *in vitro* han demostrado que el IGF2BP3 promueve la proliferación, adhesión, e invasión de las células tumorales. Adicionalmente, se ha demostrado que el IGF2BP3 se asocia con cánceres agresivos y avanzados (Bell y col., 2013; Gong y col., 2014). La sobreexpresión de IGF2BP3 se ha descrito en numerosos tipos de tumores y se correlaciona con un pronóstico pobre, estadio avanzado del tumor y metástasis, como por ejemplo en neuroblastoma, colorrectal carcinoma, colangiocarcinoma intrahepático, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, y carcinoma de células renales (Bell y col., 2013; Findeis-Hosey y Xu, 2012; Hu y col., 2014; Szarvas y col., 2014; Jeng y col., 2009; Chen y col., 2011; Chen y col., 2013; Hoffmann y col., 2008; Lin y col., 2013; Yuan y col., 2009).

Se detectaron eliminaciones adquiridas nuevas y recurrentes en IGLC1 en 3 de 45 pacientes que mostraron resistencia al inhibidor de tirosina quinasa (TKI) en leucemia mieloide crónica (CML) (Nowak y col., 2010).

La pérdida de heterocigocidad de IGLC2 se ha demostrado en el 50% de los casos informativos de meningiomas intracraneales (Kim y col., 1993).

El IGLJ3 es el gen de unión que se usa universalmente para la composición de la cadena liviana preferida de IG lambda en tricoleucemia (Forconi y col., 2008).

El IGLV2-14 es el tercer gen de IGLV más frecuente en leucemia linfocítica crónica (CLL) en comparación con los repertorios relevantes de células normales, autorreactivas, y neoplásicas (Stamatopoulos y col., 2005).

El IGLV3-21 es el gen IGLV más frecuente en leucemia linfocítica crónica (CLL) en comparación con los repertorios relevantes de células normales, autorreactivas, y neoplásicas (Stamatopoulos y col., 2005).

El INADL disminuye su expresión en cáncer de pulmón a células no pequeñas en respuesta a quimioterapia de combinación con cisplatino y gemcitabina (Ma y col., 2015).

Se demostró que el ITGA3 aumenta su expresión en carcinoma colorrectal y que

se asocia con cáncer de próstata, carcinoma epidermoide, carcinoma gástrico temprano y osteosarcoma (Yang y col., 2014c; Chong y col., 2014; Lustosa y col., 2014; Ren y col., 2014; Bauer y col., 2014; Mertens-Walker y col., 2015).

El ITGB4 se asocia con cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas orales y cáncer de ovario y se demostró que aumenta su expresión en adenocarcinoma ductal pancreático (Chen y col., 2014b; Xin y col., 2014; Zubor y col., 2015; Masugi y col., 2015; Gao y col., 2015b; Kawakami y col., 2015). El ITGB4 (también llamado CD104) tiende a asociarse con la subunidad alfa 6 y probablemente tiene un rol principal en la biología de diferentes carcinomas invasivos tales como carcinoma esofágico de células escamosas, vejiga y carcinoma de ovario (Kwon y col., 2013; Pereira y col., 2014; Chen y col., 2014b). Un polimorfismo de nucleótido simple en ITGB4 parece influenciar la agresividad tumoral y la supervivencia y puede tener un valor pronóstico para pacientes con cáncer de mama (Brendle y col., 2008).

El IVNS1ABP se asocia con mielomas múltiples positivos a BCL1/JH y podría ser un potencial marcador pronóstico de mielomas múltiples (Ni y col., 2012).

Se demostró que el JAG2 aumenta su expresión en adenocarcinoma ductal pancreático, carcinoma hepatocelular y retinoblastoma y que se asocia con mieloma múltiple, cáncer endometrial, cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de cuello y cabeza y carcinoma urotelial de vejiga (Sun y col., 2014a; Li y col., 2014b; Carvalho y col., 2014; Xiao y col., 2014; Zhang y col., 2014a; Sasnauskiene y col., 2014; Lu y col., 2014; Hu y col., 2015; Li y col., 2013).

Se halló que una hipermetilación del gen KCNK15 en diferentes líneas celulares, incluyendo cáncer de colon, leucemia, y cáncer de vejiga (Shu y col., 2006).

Se demostró que el KIF12 se sobreexpresa en cáncer de mama y que se asocia con tumores de riñón, cáncer de útero y cáncer pancreático (Katoh y Katoh, 2005; Tan y col., 2012).

El KLHDC7B se asocia con carcinoma cervical de células escamosas y es un potencial biomarcador para carcinoma cervical de células escamosas (Guo y col., 2015).

El LRP2 se asocia con carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, melanoma

maligno, linfoma primario del sistema nervioso central y carcinoma de células claras de células renales (Fernandez-Banet y col., 2014; Andersen y col., 2015; Pedersen y col., 2010; Schuetz y col., 2005; Anderson y col., 2013).

El LRRK2 se asocia con cáncer relacionado con hormonas, cáncer de mama y cánceres concomitantes distintos a los de piel en pacientes con enfermedad de Parkinson se puede asociar con cánceres hematológicos en pacientes con enfermedad de Parkinson (Ruiz-Martinez y col., 2014; Agalliu y col., 2015; Inzelberg y col., 2012).

El MACC1 se sobreexpresa en muchas entidades cancerosas incluyendo cáncer gástrico, colorrectal, de pulmón y de mama y se asocia con la progresión, metástasis del cáncer y con una baja supervivencia de los pacientes (Huang y col., 2013; Ma y col., 2013; Stein, 2013; Wang y col., 2015a; Wang y col., 2015c; Ilm y col., 2015). El MACC1 promueve la carcinogénesis a través de su interacción con las vías de señalización de beta-catenina y PI3K/AKT, lo que conduce a un incremento de c-Met y beta-catenina y de sus genes corriente abajo, incluyendo a c-Myc, ciclina D1, caspasa9, BAD y MMP9 (Zhen y col., 2014; Yao y col., 2015).

La sobreexpresión de MAGED2 se asocia con melanoma, cáncer de mama y cáncer de colon (Li y col., 2004; Strekalova y col., 2015).

Se demostró que el MET aumenta su expresión en liposarcoma desdiferenciado y que se asocia con tumores melanocíticos, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de riñón papilar hereditario y adenocarcinomas gástricos (Petrini, 2015; Finocchiaro y col., 2015; Steinway y col., 2015; Bill y col., 2015; Yeh y col., 2015).

El NAT8 se asocia con leucemia linfoblástica (Mak y col., 2014).

El NDRG1 es un supresor de metástasis en cánceres tales como cáncer pancreático y se demostró que disminuye su expresión en cáncer de próstata y en cáncer de colon, mientras que se demostró que aumenta su expresión en carcinoma hepatocelular y en adenocarcinoma cervical (Nishio y col., 2008; Cheng y col., 2011; Bae y col., 2013; Richardson y col., 2013).

Se demostró que el NLRC5 disminuye su expresión en líneas celulares tumorales derivadas del sistema linfóide (Staehli y col., 2012).

NPTX2 disminuye su expresión mediante hipermetilación de su promotor en cáncer pancreático, sarcoma de Ewing y glioblastoma (Zhang y col., 2012b; Alholle y col., 2013; Shukla y col., 2013).

El NQO2 se asocia con cáncer endometrial, microcarcinoma tiroideo papilar y cáncer de esófago (Hevir-Kene y Rizner, 2015; Malik y col., 2012; Lee y col., 2013).

La expresión de OPN3 disminuye en las líneas celulares de carcinoma hepatocelular Bel7402 y HepG2 resistentes a 5-fluorouracilo en comparación con células sensibles a 5-fluorouracilo Bel7402 y HepG2 (Jiao y col., 2012).

El PDZD2 se asocia con tumores neuroendocrinos intestinales pequeños y con cáncer de próstata (Tam y col., 2006; Rehfeld y col., 2014).

La sobreexpresión de PDZK1 puede tener un rol en la resistencia a los fármacos de mieloma múltiple (RefSeq, 2002).

Se demostró que el PFKFB3 aumenta su expresión en cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama y se asocia con cáncer pancreático, cáncer de próstata y glioblastoma (Minchenko y col., 2014; Fleischer y col., 2011; Ragnum y col., 2013).

El PLCB1 se asocia con carcinoma primario de cabeza y cuello de células escamosas, leucemia mieloide y glioblastoma multiforme (Guerrero-Preston y col., 2014; Waugh, 2014; Ramazzotti y col., 2011).

El PLIN2 está implicado en el almacenamiento de lípidos y como biomarcador plasmático para la detección de cáncer colorrectal en etapa temprana (Matsubara y col., 2011). El PLIN2 aumenta significativamente en los pacientes con carcinoma de células renales de células claras y papilares en comparación con los controles. Las concentraciones urinarias postoperativas de PLIN2 reflejan el tamaño del y la etapa tumor. La expresión de PLIN2 es significativamente superior en muestras de adenocarcinoma de pulmón que en tejidos normales y en carcinoma de pulmón de células escamosas (Zhang y col., 2014b).

La expresión de PLOD1 se asocia con la progresión del cáncer de mama humano (Gilkes y col., 2013).

Se demostró que el RKCDBP disminuye su expresión en metástasis en cerebro

de cáncer de mama y en cáncer de mama primario. Adicionalmente, el PRKCDBP se asocia con cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de pulmón y cáncer gástrico (Bai y col., 2012; Moutinho y col., 2014; Li y col., 2015; Tong y col., 2012; Wikman y col., 2012).

Se demostró que el RASGRP3 aumenta su expresión en glioblastoma, cáncer de mama y en melanoma humano y que se asocia con cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular y cánceres orales (Nagy y col., 2014; Sowalsky y col., 2015; Lee y col., 2015; Yang y col., 2011; Bhatnagar y col., 2012; Martinez-Lopez y col., 2012).

El RCN1 se localiza en la membrana plasmática en endotelio humano y líneas celulares de cánceres de próstata (RefSeq, 2002). El RCN1 se sobreexpresa en cáncer de mama (Amatschek y col., 2004).

El REN se asocia con carcinoma de células renales, cáncer pancreático, tumores de células redondas pequeñas desmoplásicas y tumores de células juxtaglomerulares (Elouazzani y col., 2014; Lee y col., 2014; Nakai y col., 2015; Araujo y col., 2015).

Se demostró que el RGS5 disminuye su expresión en cáncer de pulmón, aumenta su expresión en carcinoma de células renales de células claras, carcinoma hepatocelular, diferentes subtipos de linfoma y adenoma de paratiroides, y que se asocia con cáncer colorrectal, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón a células no pequeñas y cáncer gástrico (Volz y col., 2015; Xu y col., 2015; Wang y col., 2010a; Dannenmann y col., 2013; Koh y col., 2011; Huang y col., 2012b; Altman y col., 2012; Kumps y col., 2013; Sethakorn y Dulin, 2013; Hu y col., 2013).

El RPGRIP1L suprime el crecimiento independiente de anclaje parcialmente a través de la proteína de punto de regulación mitótica Mad2 y es un gen candidato de supresor de tumor en carcinoma hepatocelular humano (Lin y col., 2009).

Se demostró que el RRAD disminuye su expresión en cáncer de pulmón, cáncer de ovario y carcinoma nasofaríngeo y que se asocia con glioblastoma multiforme, carcinoma esofágico de células escamosas y carcinoma hepatocelular (Wang y col., 2014d; Yeom y col., 2014; Liu y col., 2015; Mo y col., 2012; Lin y Chuang, 2012; Jin y col., 2013).

El SEMA5B aumenta su expresión en carcinoma de células renales, pero hasta

ahora no se ha hallado su expresión en otros tipos de cáncer o en tejidos normales (Hirota y col., 2006).

El nivel plasmático del complejo de plasmina-alfa 2-inhibidor de plasmina demostró ser un predictor de la supervivencia en carcinoma de pulmón a células no pequeñas y se ha observado una baja actividad de alfa 2-antiplasmina en la sangre de los pacientes con carcinoma prostático (Taguchi y col., 1996; Zietek y col., 1996).

La expresión de SLC16A3 se ha asociado con pronóstico pobre en pacientes con cancer hepatocelular y mayor proliferación, migración e invasión celular en experimentos con líneas celulares (Gao y col., 2015a). Se demostró la relación funcional de SLC16A3 en la tumorigénesis en un subgrupo de muestras de cáncer pancreático (Baek y col., 2014).

Se demostró que el SLC16A4 aumenta su expresión en cáncer de pulmón a células no pequeñas, carcinoma de glándula adenoide, carcinoma ductal pancreático, carcinoma de células escamosas orales y cáncer gástrico y se asocia con cáncer de mama y carcinoma hepatocelular (Baek y col., 2014; Gao y col., 2015a; Yan y col., 2014; Jensen y col., 2014; Koo y Yoon, 2015; Granja y col., 2015; Baenke y col., 2015).

La alta expresión del transportador de aniones orgánicos 2 y el transportador de cationes orgánicos 2 es un predictor independiente de buena supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal metastásico tratado con quimioterapia basada en FOLFOX (Tashiro y col., 2014). La expresión de ARNm de SLC22A2, SLC22A11, SLC28A1, SLC28A3 y SLC29A1 disminuyó en tumores pancreáticos en comparación con tejidos pancreáticos no neoplásicos (Mohelnikova-Duchonova y col., 2013a). El SLC22A2 (también conocido como OCT2) regula la captación de cisplatino en los túbulos proximales, y la inhibición de OCT2 protege contra la nefrotoxicidad severa inducida por cisplatino (Sprowl y col., 2013).

El SLC47A1 se asocia con cáncer de próstata (Joerger y col., 2015).

La expresión de SLC6A13 se demostró aumentada en cáncer de colon (Tran y col., 2014b).

Se demostró que el SMYD2 aumenta su expresión en carcinoma primario escamoso esofágico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer gástrico y leucemia

linfoblástica aguda (Sakamoto y col., 2014; Komatsu y col., 2015; Nguyen y col., 2015).

El SYT9 se asocia con cáncer cervical y con cáncer de próstata y puede presentarse como biomarcador potencial para cáncer cervical (Chen y col., 2014c; Bao y col., 2011).

La expresión de TGFBI se demostró elevada en colangiocarcinoma, carcinoma hepático, carcinoma gástrico, carcinoma esofágico de células escamosas y carcinoma de células renales de células claras. Adicionalmente, se demostró que el TGFBI está asociado con cáncer colorrectal (Lebdai y col., 2015; Ozawa y col., 2014; Zhu y col., 2015; Han y col., 2015).

El THY1 es un gen candidato supresor tumoral en carcinoma nasofaríngeo que porta actividad antiinvasiva (Lung y col., 2010).

La expresión de la proteína TIMP1 se asocia con pronóstico pobre en pacientes con enfermedad hepática metastásica, en leucemia linfoblástica aguda infantil y en cáncer de mama (Bunatova y col., 2012; Scrideli y col., 2010; Sieuwerts y col., 2007). El TIMP1 es un marcador sérico potencial para la detección de cáncer pancreático (Slater y col., 2013). El TIMP1 es un marcador de cáncer de tiroides bien conocido (Griffith y col., 2006).

Se demostró que el TPI1 disminuye su expresión en osteosarcoma y que se asocia con cáncer de mama, carcinoma esofágico de células escamosas, glioblastoma, cáncer endometrial y cáncer de ovario (Zamani-Ahmadm Mahmudi y col., 2014; Chen y col., 2014a; Yoshida y col., 2013; Khan y col., 2013b; Gao y col., 2014).

Se demostró que el TRIP6 aumenta su expresión en sarcoma de Ewings, carcinoma nasofaríngeo y en glioblastoma y que se asocia con cáncer de mama (Pavlikova y col., 2015; Lai y col., 2010; Fei y col., 2013; Grunewald y col., 2013).

Se demostró que la transcripción de UBE2QL1 disminuye en carcinoma de células renales (Wake y col., 2013).

El UGDH se asocia con cáncer colorrectal, cáncer de próstata, adenocarcinoma seroso ovárico, cáncer de mama y carcinoma hepatocelular (Lapointe y Labrie, 1999; Konno, 2001; Fan y col., 2009; Wei y col., 2009; Wang y col., 2010b).

Los polimorfismos en el VKORC1 podrían estar asociados con el riesgo de

desarrollar cáncer de próstata (Nimptsch y col., 2009). El VKORC1 tiene influencia sobre la concentración de PIVKAll (proteína inducida por la ausencia de vitamina K), que se usa para cribar en búsqueda de carcinoma hepatocelular (Wang y col., 2010c).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La estimulación de una respuesta inmunológica depende de la presencia de antígenos reconocidos como foráneos por el sistema inmunológico del huésped. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumor ha brindado la posibilidad de usar un sistema inmunológico del huésped para intervenir en el crecimiento del tumor. Actualmente se están explorando mecanismos para vincular los brazos humoral y celular del sistema inmunológico para la inmunoterapia contra el cáncer.

Los elementos específicos de la respuesta inmunológica celular tienen la capacidad de reconocer específicamente y destruir células tumorales. El aislamiento de células T de poblaciones infiltradoras de tumores o de sangre periférica sugiere que dichas células juegan un papel importante en la defensa inmunológica natural contra el cáncer. Las células T positivas para CD8 en particular, que reconocen péptidos portados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC) de usualmente entre 8 y 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o productos ribosomales defectuosos (DRIP) localizados en el citosol, cumplen un papel importante en esta respuesta. Las moléculas de MHC del humano también se designan como antígenos de leucocitos humanos (HLA).

El término “respuesta de células T” se refiere a la proliferación específica y activación de funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. Para las células T citotóxicas restringidas a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden ser la lisis de células blanco pulsadas con péptidos, pulsadas con péptido-precursor o presentadoras de péptido naturalmente, secreción de citoquinas, preferiblemente interferón-gamma, TNF-alfa, o IL-2 inducido por péptido, secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptido, o degranulación.

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 o 12 o mayor, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos de la invención) pueden tener 13, 14, 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 hacer notar que las sales de los péptidos de acuerdo con la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en sus estados *in vivo*, ya que los péptidos no son sales *in vivo*.

El término “péptido” también incluye “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 epítopo o epítopos 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 epítopos 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 “epitope” de linfocito T de clase I 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 *loci* 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 *loci*.

Tabla 5: Frecuencias de expresión F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y el más frecuente de los serotipos HLA-DR. Las frecuencias se deducen de las frecuencias de haplotipo Gf en la población americana adaptado de Mori y col. (Mori y col., 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$. Las combinaciones de A*02 o A*24 con determinados alelos de HLA-DR podrían estar enriquecidas o ser menos frecuentes que lo esperado a partir de sus frecuencias simples debido al desequilibrio de unión. Para detalles referirse a Chanock y col. (Chanock y col., 2004).

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia del alelo
A*02	Caucásica (Norteamérica)	49,1%
A*02	Afroamericana (Norteamérica)	34,1%
A*02	Asiática Americana (Norteamérica)	43,2%
A*02	Latinamericana (Norteamérica)	48,3%
DR1	Caucásica (Norteamérica)	19,4%
DR2	Caucásica (Norteamérica)	28,2%
DR3	Caucásica (Norteamérica)	20,6%

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia del alelo
DR4	Caucásica (Norteamérica)	30,7%
DR5	Caucásica (Norteamérica)	23,3%
DR6	Caucásica (Norteamérica)	26,7%
DR7	Caucásica (Norteamérica)	24,8%
DR8	Caucásica (Norteamérica)	5,7%
DR9	Caucásica (Norteamérica)	2,1%
DR1	Africana (Norte) Americana	13,20%
DR2	Africana (Norte) Americana	29,80%
DR3	Africana (Norte) Americana	24,80%
DR4	Africana (Norte) Americana	11,10%
DR5	Africana (Norte) Americana	31,10%
DR6	Africana (Norte) Americana	33,70%
DR7	Africana (Norte) Americana	19,20%
DR8	Africana (Norte) Americana	12,10%
DR9	Africana (Norte) Americana	5,80%
DR1	Asiática (Norte) Americana	6,80%
DR2	Asiática (Norte) Americana	33,80%
DR3	Asiática (Norte) Americana	9,20%
DR4	Asiática (Norte) Americana	28,60%
DR5	Asiática (Norte) Americana	30,00%
DR6	Asiática (Norte) Americana	25,10%
DR7	Asiática (Norte) Americana	13,40%
DR8	Asiática (Norte) Americana	12,70%
DR9	Asiática (Norte) Americana	18,60%
DR1	Latino (Norte) Americana	15,30%
DR2	Latino (Norte) Americana	21,20%

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia del alelo
DR3	Latino (Norte) Americana	15,20%
DR4	Latino (Norte) Americana	36,80%
DR5	Latino (Norte) Americana	20,00%
DR6	Latino (Norte) Americana	31,10%
DR7	Latino (Norte) Americana	20,20%
DR8	Latino (Norte) Americana	18,60%
DR9	Latino (Norte) Americana	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	Estados Unidos	22%
A*24	Samara Rusia	20%
A*24	Sudamérica	20%
A*24	Europa	18%

Los péptidos de la invención, preferiblemente cuando se incluyen en una vacuna de la invención como se describe en la presente se unen a A*02. Una vacuna también puede incluir péptidos de unión a todo MHC de clase II. Por lo tanto, la vacuna de la invención puede usarse para tratar el cáncer en pacientes que son positivos para A*02,

mientras no es necesario selección de los alotipos de MHC de clase II debido a la naturaleza de unión a todo de estos péptidos.

Si los péptidos A*02 de la invención se combinan con péptidos que se unen a otro alelo, por ejemplo A*24, puede tratarse un mayor porcentaje de cualquier población de pacientes en comparación con enfocarse a cada alelo de MHC de clase I solo. Si bien en la mayoría de las poblaciones menos del 50% de los pacientes podrían enfocarse a cualquier alelo solo, una vacuna que comprende los epitopes HLA-A*24 y HLA-A*02 puede tratar por lo menos 60% de los pacientes en cualquier población relevante. Específicamente, los siguientes porcentajes de pacientes serán positivos para por lo menos uno de estos alelos en diferentes regiones: EE.UU. 61%, Europa occidental 62%, China 75%, Corea del sur 77%, Japón 86% (calculado de www.allelefrequencies.net).

En una forma de realización preferida, el término “secuencia nucleotídica” se refiere 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 como se utiliza en la presente memoria el término “un nucleótido que codifica para un péptido” se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido y que incluye codones artificiales (sintetizados por el hombre) de inicio y de terminación compatibles con el sistema biológico en el que la secuencia es expresada por, por ejemplo, una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de TCR.

Tal como se usa en la presente, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye ácido nucleico de hebra simple y hebra doble. Por lo tanto, por ejemplo para ADN, la secuencia específica, a menos que el contexto lo indique de otra manera, se refiere al ADN de hebra simple de dicha secuencia, el dúplex de la mencionada secuencia con su complemento (ADN de hebra doble) y el complemento de la mencionada secuencia.

El término “región codificante” se refiere a la porción de un gen que codifica naturalmente o normalmente para el producto de expresión de ese gen en su ambiente genómico natural, es decir, la región codificante *in vivo* para el producto de expresión nativo del gen.

La región codificante puede derivar de un gen no mutado (“normal”), mutado o alterado, o incluso puede derivar de una secuencia de ADN, o gen, completamente sintetizado en el laboratorio usando métodos bien conocidos para aquellos con experiencia en el arte de la síntesis del ADN.

El término “producto de expresión” se refiere 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 codificante, 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 una construcción 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 en dirección 3' (*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 partida 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 abarca 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, usualmente de una secuencia de péptido, de polipéptido o de ácido nucleico 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
 - (iiii) 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 identidad porcentual calculada arriba resulte menor que la identidad porcentual especificada.

Como se mencionó precedentemente, la presente invención provee de esta manera un péptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114 o una variante de la misma que es 88% homóloga con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114, o una variante de la misma que inducirá la reactividad cruzada de las células T con el péptido mencionado. Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) clase-I o versiones alargadas de los péptidos mencionados a 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 y 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 y col., 2006; Colombetti y col., 2006; Fong y col., 2001; Zaremba y col., 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, sustituidas por 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 de la secuencia de aminoácidos indicadas en las SEQ ID N.º 114. 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 células T activadas.

Estos células 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 y col., 1999; Godkin y col., 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 114, 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 las células T activadas, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido cognado como se define en los aspectos de la invención.

Los péptidos originales (sin modificar) como se divulgan en la presente se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos dentro de la cadena peptídica, si no se menciona otra cosa. Preferiblemente esas sustituciones se localizan en el extremo de la cadena aminoacídica. Dichas sustituciones pueden ser de una naturaleza conservativa, por ejemplo, en donde se reemplaza un aminoácido por un aminoácido de estructura y características similares, tales como cuando se reemplaza un aminoácido hidrofóbico por otro aminoácido hidrofóbico. Incluso, más conservativo sería el reemplazo de aminoácidos de tamaño o estructura química igual o similar, tal como el reemplazo de leucina por isoleucina. En los estudios de variaciones de secuencia en familias de proteínas homólogas de origen natural, ciertas sustituciones de aminoácido son toleradas más frecuentemente que otras, y con frecuencia estas muestran correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad, e hidrofobicidad entre el aminoácido original su reemplazo, y esa es la base para la definición de “sustituciones conservativas.”

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

Las sustituciones menos conservativas pueden involucrar el reemplazo de un aminoácido por otro que tiene características similares pero que es algo diferente de tamaño, tal como el reemplazo de un residuo de alanina por uno de isoleucina. Los reemplazos altamente no conservativos pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por uno que es polar, o incluso por uno que es de carácter básico. Dichas sustituciones “radicales” no pueden, sin embargo, descartarse como potencialmente ineficaces debido a que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las

sustituciones de radicales podrían dar origen a efectos azarosos no predecibles de ninguna forma a partir de los principios químicos simples.

Por supuesto, dichas sustituciones pueden implicar estructuras distintas a los L-aminoácidos comunes. Por consiguiente, los D-aminoácidos podrían sustituir a los L-aminoácidos que comúnmente se hallan en los péptidos antigénicos de la invención y aun así estar abarcados por la divulgación de la presente. Además, también se pueden usar aminoácidos no estándares (es decir, distintos a los aminoácidos proteínogénicos comunes de origen natural) para propósitos de sustitución para producir polipéptidos inmunógenos e inmunogénicos de acuerdo con la presente invención.

Si se halla que las sustituciones en más de una posición resultan en un péptido con actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor como se define más adelante, entonces se ensayarán combinaciones de esas sustituciones para determinar si las sustituciones combinadas resulten en efectos aditivos o sinérgicos sobre la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirían no más de cuatro posiciones dentro del péptido en forma simultánea.

Un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos que se indica en la presente, puede tener uno o dos aminoácidos de no anclaje (véase más adelante en relación al motivo de anclaje) intercambiados sin que la capacidad para unir una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) clase I o II sea sustancialmente cambiada o negativamente afectada, en comparación con el péptido sin modificar. En otra forma de realización, en un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se indica en la presente, se pueden intercambiar uno o dos aminoácidos con sus respectivos compañeros de intercambio conservativo (véase más adelante en la presente) sin que la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) clase I o II esté sustancialmente cambiada, o negativamente afectada, en comparación con el péptido sin modificar.

Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyan 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 de acuerdo con SEQ ID NO: 1, 4 y 5.

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 1	A	L	I	V	S	L	P	Y	L
Variante									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

También pueden ser adecuados péptidos más largos (alargados). Es posible que los epitopes 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 de proteínas que incluyan el epitope real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epitope de interés sean residuos que no afecten sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epitope durante el procesamiento.

Los péptidos de la invención pueden alargarse hasta cuatro aminoácidos, es decir pueden agregarse 1, 2, 3 o 4 aminoácidos a cualquier extremo en cualquier combinación entre 4:0 y 0:4. Las combinaciones de las elongaciones de acuerdo con la invención

pueden encontrarse en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.7.**

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

Extremo C-terminal	Extremo 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
Extremo N-terminal	Extremo 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 puede usarse para mejorar la estabilidad o solubilidad de los péptidos.

Por lo tanto, los epitopes de la presente invención pueden ser idénticos a los epitopes de origen natural asociados a tumor o específicos de tumor o pueden incluir epitopes que difieren en no más de cuatro residuos del péptido de referencia, siempre que tengan actividad antigénica sustancialmente idéntica.

En una forma de realización alternativa, el péptido se alarga en uno o ambos extremos en más de 4 aminoácidos, preferiblemente hasta una longitud total de hasta 30 aminoácidos. Esto puede llevar a péptidos de unión a MHC de clase II. La unión a MHC de clase II puede ser evaluada por métodos conocidos en el arte.

En consecuencia, la presente invención provee péptidos y variantes de epitopes 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 alargados 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 las células T específicas por un péptido de acuerdo con la presente invención se ensayan contra los péptidos sustituidos, la concentración del péptido a la cual los péptidos sustituidos alcanzan la mitad del aumento máximo en la lisis en relación al basal no es más de aproximadamente 1 mM, preferiblemente no más de aproximadamente 1 μ M, más preferiblemente no más de aproximadamente 1 nM, y aún más preferiblemente no más de aproximadamente 100 pM, y más preferiblemente no más de aproximadamente 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por las células T de más de un individuo, por lo menos dos, y más preferiblemente 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 1a SEQ ID N.º 114.

“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 114 o una variante de las mismas, contiene segmentos adicionales de aminoácidos en los extremos N- y/o C-terminal que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un epítopo para el epítopo 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 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 como se describe en la presente.

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 col. (1997) (Meziere y col., 1997), 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 col. demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T colaboradores. 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: -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. La US 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH₂-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 NaCNBH₃.

Los péptidos que comprenden las secuencias descritas precedentemente pueden sintetizarse 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 carboxilo 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. CRC 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, amidación, 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 carbamoylación 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 y col. (John Wiley and Sons NY 1995-2000), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

En resumen, la modificación de p. ej., los residuos arginilos 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 de 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 terapéuticas y péptidos 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 utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliámida, como muestran Lukas y col. (Lucas y col., 1981) y por las referencias que se citan 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 la lisina y la histidina), derivados tritilados (en la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonílicos (en la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparagina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibencidrilo 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 asparagina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexil-carbodiimida/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 utilizados normalmente son etanoditiol, 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 T, y col., 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 una sola o una 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.

Con el objetivo de seleccionar péptidos muy presentados, se calcula un perfil de presentación que muestra la mediana de la presentación de muestras así como la variación de duplicados. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con un basal de las muestras de tejido normal. Cada uno de estos perfiles pueden entonces consolidarse en una puntuación de sobrerepresentación por cálculo del valor p de un modelo de efectos mezclados lineales (Pinheiro y col., 2015) ajustando para pruebas múltiples por Tasa de Descubrimiento de Falsos (Benjamini y Hochberg, 1995).

Para la identificación y cuantificación relativa de ligandos de HLA por espectrometría de masa, las moléculas HLA de muestras de tejido congeladas rápidamente se purificaron y se aislaron los péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y se identificaron las secuencias por experimentos en línea de

cromatografía líquida de nano-electroaspersión-ionización (nanoESI)-espectrometría de masa (LC-MS). Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron por comparación del patrón de fragmentación de TUMAP naturales registrado de las muestras de RCC (N = 18 muestras *02-positivas) con los patrones de fragmentación de los correspondientes péptidos de referencia sintéticos de secuencias idénticas. Debido a que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas de HLA de los tumores primarios, estos resultados proveen evidencia directa del procesamiento y presentación natural de los péptidos identificados en el tejido de cáncer primario obtenido de los 18 pacientes con RCC.

Los elementos de procesamiento de datos de descubrimiento XPRESIDENT® v2.1 (véase, por ejemplo, US 2013-0096016, que se incorpora en su totalidad a la presente se modo de referencia) permite la identificación y selección de candidatos de vacunas peptídicas con presentación aumentada relevantes en base a la cuantificación relativa directa de niveles de péptidos restringidos a HLA en los tejidos cancerosos en comparación a diferentes tejidos y órganos no cancerosos. Esto se logró por el desarrollo de cuantificación diferencial libre de marcas usando los datos adquiridos de LC-MS procesados por un conjunto de elementos de procesamiento de datos registrado, que combina algoritmos para la identificación de secuencia, agrupamiento espectral, recuento de iones, alineamiento de tiempo de retención, deconvolución de estado de carga y normalización.

Se establecieron niveles de presentación que incluyen estimaciones de error para cada péptido y muestra. Se han identificados péptidos presentados exclusivamente en tejido tumoral y péptidos con presentación aumentada en tumores versus tejidos y órganos no cancerosos.

Los complejos de HLA y péptido de muestras de tejido con RCC se purificaron y los péptidos asociados a HLA se aislaron y se analizaron mediante LC-MS (véanse los ejemplos). Todos los TUMAPs contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de RCC primarias que confirman su presentación en RCC primario.

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos de RCC y normales se cuantificaron

usando el recuento de iones de los datos de LC-MS libres de marcas. El método asume que las áreas de señal de LC-MS de un péptido se correlacionan con su abundancia en la muestra. Todas las señales cuantitativas de un péptido en diferentes experimentos de LC-MS se normalizaron en base a la tendencia central, se promediaron por muestra y se juntaron en un gráfico de barras, llamado perfil de presentación. El perfil de presentación consolida diferentes métodos de análisis como búsqueda de base de datos de proteínas, agrupamiento espectral, deconvolución de estadio de carga (descarga) y alineamiento de tiempo de retención y normalización.

Adicionalmente, los elementos de procesamiento de datos de descubrimiento XPRESIDENT® v2.x permiten la cuantificación absoluta directa de los niveles de péptidos restringidos por MHC, preferiblemente HLA, en cáncer u otros tejidos infectados. Brevemente, el conteo celular total se calculó a partir del contenido de ADN total de la muestra de tejido analizada. La cantidad de péptido total para un TUMAP en una muestra de tejido se midió por nanoLC-MS/MS como la relación de TUMAP natural y una cantidad conocida de una versión marcada con isótopo del TUMAP, el llamado estándar interno. La eficacia del aislamiento de TUMAP se determinó por aumento de la cantidad de complejos péptido:MHC de todos los TUMAP seleccionados en el lisado de tejido en el punto más temprano posible del procedimiento de aislamiento de TUMAP y su detección por nanoLC-MS/MS luego de completar el procedimiento de aislamiento del péptido. El conteo celular total y la cantidad de péptido total se calcularon a partir de medidas por triplicado por muestras de tejido. Las eficacias de aislamiento específicas de péptido se calcularon como un promedio de 10 experimentos de aumento de la cantidad cada uno medido por triplicado (véase el Ejemplo 6 y Tabla 12).

La presente invención provee péptidos que son útiles para el tratamiento de cánceres/tumores, preferiblemente RCC que sobrerepresenta o que presenta exclusivamente los péptidos de la invención. Estos péptidos se mostraron por espectrometría de masa como naturalmente presentados por moléculas HLA en muestras de RCC humano primario.

Muchos de los genes/proteínas fuente (también llamadas “proteínas de longitud completa” o “proteínas subyacentes”) de los que derivan los péptidos mostraron estar

altamente sobreexpresados en cáncer en comparación con tejidos normales – “tejidos normales” en relación a esta invención designa a células renales sanas u otras células tisulares normales, que demuestran un alto grado de asociación tumoral de los genes fuente (véase el Ejemplo 2). Más aún, los péptidos en sí mismos se sobrepresentan fuertemente en tejido– “tejido tumoral” en relación a esta invención designa a una muestra de un paciente que sufre de RCC, pero no en tejidos normales (véase el Ejemplo 1).

Los péptidos unidos a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico, específicamente linfocitos T. Las células T pueden destruir a las células que reconocieron al complejo HLA/péptido, por ejemplo células de RCC que presentan los péptidos derivados.

Los péptidos de la presente invención han demostrado tener capacidad de estimulación de las respuestas de células T y/o con presentación aumentada y por lo tanto se pueden usar para la producción de anticuerpos y/o TCR, tales como TCR solubles, de acuerdo con la presente invención (véase el Ejemplo 3, Ejemplo 4). Adicionalmente, cuando se complejan los péptidos con las respectivas MHC, se pueden usar para la producción de anticuerpos y/o TCR, en particular TCR solubles, de acuerdo con la presente invención, también. Los métodos respectivos son bien conocidos para las personas con experiencia en el arte, y se pueden hallar también en la literatura correspondiente. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención son útiles para generar una respuesta inmunológica en un paciente, mediante lo que se pueden destruir las células tumorales. Una respuesta inmunológica en un paciente puede inducirse por administración directa de los péptidos descritos o sustancias precursoras adecuadas (por ejemplo péptidos elongados, proteínas, o ácidos nucleicos que codifican para estos péptidos) al paciente, idealmente en combinación con un agente potenciador de la inmunogenicidad (es decir un adyuvante). Se puede esperar que la respuesta inmunológica que se origina a partir de dicha vacunación terapéutica sea altamente específica contra las células tumorales debido a que los péptidos blanco de la presente invención no están presentes sobre tejidos normales en números de copia comparables, lo que previene el riesgo de reacciones autoinmunes indeseadas contra células normales

en el paciente.

La presente descripción además se relaciona con receptores de células T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta ("TCR alfa/beta"). También se proveen péptidos con capacidad de unirse a los TCR y anticuerpos, cuando se presentan mediante una molécula MHC. La presente descripción también se relaciona con ácidos nucleicos, vectores y células huéspedes para expresar TCR y péptidos de la presente descripción; y métodos para usar los mismos.

El término "receptor de células T" (abreviado TCR) se refiere a una molécula heterodimérica que comprende una cadena polipeptídica alfa (cadena alfa) y una cadena polipeptídica beta (cadena beta), en donde el receptor heterodimérico es capaz de unirse a un péptido antígeno presentado por una molécula HLA. El término también incluye los llamados TCR gamma/delta.

En una forma de realización la descripción provee un método para producir un TCR como se describe en la presente, en donde el método comprende cultivar una célula huésped con capacidad de expresar el TCR bajo condiciones adecuadas para promover la expresión del TCR.

La descripción, en otro aspecto, se relaciona con métodos de acuerdo con la descripción, en donde el antígeno se carga sobre moléculas MHC de clase I o II expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o célula presentadora de antígeno artificial mediante el contacto de una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno o se carga el antígeno sobre tetrameros MCH de clase I o II mediante la tetramerización de monómeros de complejo antígeno/MHC de clase I o II.

Las cadenas alfa y beta de los TCR alfa/beta, y las cadenas gamma y delta de los TCR gamma/delta, en general se consideran cada uno como teniendo dos "dominios", llamados dominios variables y constantes. El dominio variable consiste en una concatenación de región variable (V), y región de conexión (J). El dominio variable también puede incluir una región líder (L). Las cadenas beta y delta también pueden incluir una región de diversidad (D). Los dominios constantes alfa y beta también pueden incluir dominios transmembrana C-terminales (TM) que anclan a las cadenas alfa y beta a

la membrana celular.

Con respecto a los TCR gamma/delta, el término “dominio variable gamma de TCR” tal como se usa en la presente se refiere a la concatenación de la región V gamma de TCR (TRGV) con la región líder (L), y la región J gamma de TCR (TRGJ), y el término dominio constante gamma de TCR se refiere a la región TRGC extracelular, o a una secuencia TRGC C-terminal truncada. De forma similar, el término “dominio variable delta de TCR” se refiere a la concatenación de la región V delta de TCR (TRDV) sin la región líder (L) y la región D/J delta de TCR (TRDD/TRDJ), y el término “dominio constante delta de TCR” se refiere a la región extracelular de TRDC, o a una secuencia TRDC C-terminal truncada.

Los TCR de la presente descripción preferiblemente se unen a un complejo de péptido y molécula HLA con una afinidad de unión (KD) de aproximadamente 100 μ M o menos, aproximadamente 50 μ M o menos, aproximadamente 25 μ M o menos, o aproximadamente 10 μ M o menos. Son más preferidos los TCR de alta afinidad que tienen afinidades de unión de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos. Los ejemplos no limitantes de rangos preferidos de afinidad de unión para los TCR de la presente invención incluyen entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 10 nM; entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 20 nM; entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 30 nM; entre aproximadamente 30 nM y aproximadamente 40 nM; entre aproximadamente 40 nM y aproximadamente 50 nM; entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 60 nM; entre aproximadamente 60 nM y aproximadamente 70 nM; entre aproximadamente 70 nM y aproximadamente 80 nM; entre aproximadamente 80 nM y aproximadamente 90 nM; y entre aproximadamente 90 nM y aproximadamente 100 nM.

Tal como se usa en la presente en conexión con los TCR de la presente descripción, “unión específica” y las variantes gramaticales del mismo se usan para designar a un TCR que tiene una afinidad de unión (KD) por un complejo de péptido y molécula HLA de 100 μ M o menos.

Los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener un puente disulfuro introducido entre sus dominios constantes. Los TCR preferidos de este

tipo incluyen a los que tienen una secuencia de dominio constante TRAC y secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 excepto porque la Thr 48 de TRAC y la Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 se reemplazan por residuos de cisteína, en donde dichas cisteínas forman un puente disulfuro entre la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR.

Con o sin el enlace intercatenario introducido que se mencionó previamente, los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, y la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR se pueden conectar por un puente disulfuro nativo entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

Los TCR de la presente descripción pueden comprender una marca detectable que se elige del grupo que consiste en un radionúclido, un fluoróforo y biotina. Los TCR de la presente descripción se pueden conjugar a un agente terapéuticamente activo, tal como un radionúclido, un agente quimioterapéutico, o una toxina.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción que tiene por lo menos una mutación en la cadena alfa y/o que tiene por lo menos una mutación en la cadena beta, tiene una glicosilación modificada en comparación con los TCR no mutados.

En una forma de realización, un TCR que comprende por lo menos una mutación en la cadena alfa de TCR y/o en la cadena beta de TCR tiene una afinidad de unión, y/o una vida media para un complejo de péptido y molécula HLA, que es por lo menos el doble que la de un TCR que comprende la cadena alfa de TCR sin mutar y/o la cadena beta de TCR sin mutar. El aumento de afinidad de los TCR específicos de tumor, y su uso, recae en la existencia de una ventana para las afinidades óptimas de TCR. La existencia de dicha ventana se basa en las observaciones de que los TCR específicos para patógenos restringidos a HLA-A2 tienen valores de KD que en general son aproximadamente 10 veces menores en comparación con los TCR específicos para autoantígenos asociados a tumor restringidos a HLA-A2. Ahora se sabe que, a pesar de que los antígenos tumorales tienen el potencial de ser inmunogénicos, debido a que los tumores surgen de células propias del individuo, se verán foráneas por el sistema

inmunológico las proteínas mutantes o proteínas con procesamiento traduccional alterado. Los antígenos que están sobreexpresados o con regulación aumentada (llamados autoantígenos) no necesariamente inducen una respuesta inmunológica funcional contra el tumor: las células T que expresan TCR que son altamente reactivos contra estos antígenos se seleccionarán negativamente dentro del timo en un proceso conocido como tolerancia central, lo que significa que solo las células T con TCR de baja afinidad por los autoantígenos serán los que permanezcan. Por lo tanto, la afinidad de los TCR o variantes de la presente descripción contra los péptidos de acuerdo a la invención pueden potenciarse por métodos bien conocidos en el arte.

La presente descripción además se relaciona con un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente descripción, en donde dicho método comprende incubar PBMC de donantes sanos HLA-A*02-negativos con monómeros de A2/péptido, incubar los PBMC con ficoeritrina tetramérica (PE) y aislar las células T con alta avidez por análisis de selección células activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

La presente descripción además se relaciona con un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente descripción, en donde dicho método comprende obtener un ratón transgénico con los loci génicos completos de TCR $\alpha\beta$ humanos (1,1 y 0,7 Mb), cuyas células T expresan un repertorio diverso de TCR humanos que compensan la deficiencia de TCR de ratón, inmunizar el ratón con péptido de interés, incubar los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con ficoeritrina tetramérica (PE), y aislar las células T de alta avidez por análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

En un aspecto, para obtener células T que expresan los TCR de la presente descripción, se clonan ácidos nucleicos que codifican para cadenas alfa de TCR y/o beta de TCR de la presente descripción en vectores de expresión, tales como retrovirus gamma o lentivirus. Los virus recombinantes se generan y se ensayan para ver su funcionalidad, tal como especificidad por el antígeno y avidez funcional. Luego se usa una alícuota del producto final para transducir la población de células T blanco (en general purificadas a partir de PBMC de paciente), que se expande antes de su infusión en el paciente.

En otro aspecto, para obtener células T que expresan TCR de la presente descripción, se sintetizan ARN de TCR por técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, sistemas de transcripción *in vitro*. Los ARN de TCR sintetizados *in vitro* se introducen luego en células T CD8+ primarias obtenidas de donantes sanos por electroporación para re expresar las cadenas alfa de TCR y/o beta de TCR específicas de tumor.

Para incrementar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican para los TCR de la presente descripción se pueden conectar en forma operable con promotores fuertes, tales como repeticiones terminales largas retrovirales (LTR), citomegalovirus (CMV), U3 de virus de célula madre murina (MSCV), fosfoglicerato quinasa (PGK), β -actina, ubiquitina, y un promotor compuesto de virus de simio 40 (SV40)/CD43, factor de elongación (EF)-1a y el promotor de virus formador de foco en bazo (SFFV). En una forma de realización preferida, el promotor es heterólogo al ácido nucleico que se está expresando.

Además de los promotores fuertes, los casetes de expresión de TCR de la presente descripción pueden contener elementos adicionales que pueden aumentar la expresión del transgen, incluyendo un tracto de polipurina central (cPPT), que promueve la translocación nuclear de construcciones de lentivirus (Follenzi y col., 2000), y el elemento regulatorio posttraduccional de virus de hepatitis de marmota (wPRE), que incrementa el nivel de expresión transgénica por incremento de la estabilidad de ARN (Zufferey y col., 1999).

Las cadenas alfa y beta de un TCR de la presente invención pueden estar codificadas por ácidos nucleicos localizados en vectores separados, o pueden estar codificados por polinucleótidos localizados en el mismo vector.

Conseguir un alto nivel de expresión superficial de TCR requiere que tanto la cadena alfa de TCR como la beta de TCR del TCR introducido se puedan transcribir en altos niveles. Para hacerlo, las cadenas alfa de TCR y beta de TCR de la presente descripción se pueden clonar en construcciones bicistrónicas en un vector individual, que se ha mostrado que tiene capacidad de superar este obstáculo. El uso de un sitio de entrada intrarribosomal viral (IRES) entre las cadenas alfa de TCR y beta de TCR resulta en la expresión coordinada de ambas cadenas, debido a que las cadenas alfa de TCR y

beta de TCR se generan a partir de un transcrito individual que se rompe en dos proteínas durante la traducción, asegurando que se produce una proporción equimolar de cadenas alfa de TCR y beta de TCR. (Schmitt y col. 2009).

Los ácidos nucleicos que codifican para los TCR de la presente descripción se pueden optimizar por codones para incrementar su expresión en una célula huésped. La redundancia del código genético permite a algunos aminoácidos estar codificados por más de un codón, pero ciertos codones son menos “óptimos” que otros debido a la disponibilidad relativa de ARNt coincidentes así como otros factores (Gustafsson y col., 2004). La modificación de las secuencias génicas de alfa de TCR y beta de TCR de forma que cada aminoácido esté codificado por el codón óptimo para su expresión génica en mamíferos, así como la eliminación de motivos de inestabilidad de ARNm o sitios de corte y empalme crípticos, ha demostrado aumentar significativamente la expresión de las cadenas alfa de TCR y beta de TCR (Scholten y col., 2006).

Adicionalmente, la falta de apareamiento entre las cadenas de TCR introducidas y endógenas puede resultar en la adquisición de especificidades que poseen un riesgo significativo de autoinmunidad. Por ejemplo, la formación de dímeros de TCR mixtos puede reducir el número de moléculas CD3 disponibles para formar apropiadamente los complejos de TCR apareados, y por lo tanto puede disminuir significativamente la avidez funcional de las células que expresan el TCR introducido (Kuball y col., 2007).

Para reducir la falta de apareamiento, el dominio de extremo C terminal de las cadenas de TCR intrducidas de la presente descripción se pueden modificar con el objetivo de promover la afinidad intercatenaria, mientras que se disminuye la capacidad de las cadenas introducidas para aparearse con los TCR endógenos. Estas estrategias puede incluir reemplazar de los dominios de extremo C-terminal humanos de alfa de TCR y beta de TCR por sus contrapartes murinas (dominio de extremo C terminal murinizado); generar un segundo puente disulfuro intercatenario en el dominio de extremo C terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína en ambas cadenas alfa de TCR y beta de TCR de los TCR introducidos (modificación de cisteínas); hacer interacción por intercambio de los residuos de los dominios de extremo C-terminal de cadenas alfa de TCR y beta de TCR (“knob-in-hole”); y fusionar los dominios variables de

las cadenas alfa de TCR y beta de TCR directamente a CD3 ζ (fusión a CD3 ζ). (Schmitt y col. 2009).

En una forma de realización, una célula huésped se modifica para expresar un TCR de la presente descripción. En formas de realización preferidas, la célula huésped es una célula T progenitora humana o célula T. En algunas formas de realización la célula T o la célula T progenitora se obtiene a partir de un paciente con cáncer. En otras formas de realización la célula T o la progenitora de célula T se obtiene a partir de un donante sano. Las células huéspedes de la presente descripción pueden ser alogénicas o autólogas con respecto a un paciente a tratar. En una forma de realización, el huésped es una célula T gamma/delta transformada para expresar un TCR alfa/beta.

Una “composición farmacéutica” es una composición adecuada para su administración a un ser humano en una estrategia médica. Preferiblemente, una composición farmacéutica es estéril y se produce de acuerdo con las guías de GMP.

Las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos ya sea en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también previamente). Tal como se usa en la presente, “una sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a un derivado de los péptidos divulgados en donde el péptido se modifica por la elaboración de sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (típicamente en donde la forma neutra del fármaco tiene un grupo–NH₂ neutro) que implica la reacción con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados para preparar sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, por ejemplo, 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 cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, y similares, así como ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Por el contrario, la preparación de sales básicas de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan usando una base farmacéuticamente aceptable tales 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 como sales de ácido acético (acetatos), trifluoracetatos o ácido clorhídrico (cloruros).

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es un inmunoterapéutico tal como una vacuna. La misma se puede administrar directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v., o aplicarse *ex vivo* a las células derivadas del paciente o a una línea celular humana que subsiguientemente se administran al paciente, o se usan *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunes derivadas del paciente, que luego se administran nuevamente al paciente. Si el ácido nucleico se administra a las células *in vitro*, puede ser útil para las células transfectar de forma de coexpresar citoquinas estimuladoras inmunes, tales como interleuquina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o puede estar combinado con un adyuvante estimulador inmune (véase más adelante) o usarse en combinación con citoquinas estimuladores inmunes, o se puede administrar con un sistema de administración adecuado, por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar a un transportador adecuado tal como hemocianina de *Fissurellidae* (KLH) o manano (véase WO 95/18145 y (Longenecker y col., 1993)). El péptido también se puede rotular, puede ser una proteína de fusión, o puede ser una molécula híbrida. Los péptidos cuya secuencia se da en la presente invención se espera que estimulen a las células T CD4 o CD8. Sin embargo, la estimulación de las células T CD8 es más eficaz en presencia ayuda de células T asistentes CD4 provistas. Por consiguiente, para los epitopes de MHC de clase I que estimulan a las células T CD8, el compañero de fusión o secciones de una molécula híbrida proveen adecuadamente epitopes que estimulan a las células T CD4 positivas. Los epitopes de estimulación de CD4 y CD8 son bien conocidos e incluyen a los que se identifican en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende por lo menos un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 114, y por lo menos un péptido adicional, preferiblemente entre dos y 50, más preferiblemente entre dos y 25, incluso más preferiblemente entre dos y 20 y más preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis,

diecisiete o dieciocho péptidos. El o los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas de MHC de clase I.

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido) que codifica un péptido o una 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, Connecticut, 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 col. (Saiki y col., 1998). 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 reveladas, por ejemplo, en US 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 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 reveladas 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 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, California 92037, EE. UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (Ylp) 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, poliA de la hGH, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la pre-pro-tripsina (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 los 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. Estas construcciones también pueden usarse para la terapia del cáncer, y puede inducir respuestas inmunológicas que involucran MHC I y 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, Maryland, EE. UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, Maryland, 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 están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California 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, véanse, por ejemplo, Cohen y col. (Cohen y col., 1972), y (Green y Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura aparece descrita en Sherman y col. (Sherman y col., 1986). El método de Beggs (Beggs, 1978) también resulta 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, Maryland 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 *Food and Drug Administration*

(FDA) de EE. UU. el 29 de abril de 2010 para el tratamiento del cáncer de próstata hormonorrefractario metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel-T) (Rini y col., 2006; Small y col., 2006).

Un aspecto adicional de la invención provee un método para producir un péptido o su variante, en donde el método comprende cultivar una célula huésped y aislar el péptido de la célula huésped o su medio de cultivo.

En otra forma de realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se usan en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante pueden producirse para la inyección intravenosa (i.v.), inyección subcutánea (s.c.), inyección intradérmica (i.d.), inyección intraperitoneal (i.p.), inyección intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos de inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m., e i.v. Los métodos preferidos de inyección de ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Pueden administrarse dosis de por ejemplo entre 50 µg y 1,5 mg, preferentemente entre 125 µg y 500 µg, del péptido o ADN y dependerá del péptido o ADN respectivo. Las dosificaciones de este rango se usaron exitosamente en ensayos previos (Walter y col., 2012).

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o 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. Se puede consultar una revisión general, por ejemplo, Teufel y col. (Teufel y col., 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. También pueden utilizarse métodos de introducción físicos, como la «pistola génica». 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 células T positivas para CD8 y linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, y 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 y Krummel, 1995 The Yin and Yang of T cell costimulation. Science. 1995 Nov 10;270(5238):932-3. Review). También pueden utilizarse 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 de 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 y col. 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en 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 humores 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 T_{H1} y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta T_{H1} 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 T_{H2} . 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, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis plena de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). En US 6.406.705 B1 se 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, temsirolimus, 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 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 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,

saborizantes, 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 y col. 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 notar que la respuesta inmunológica disparada por la vacuna de acuerdo con la invención ataca el cáncer e diferentes etapas celulares y diferentes etapas del desarrollo. Adicionalmente, se atacan vías de señalización asociadas con diferentes tipos de cáncer. Esta es una ventaja por sobre las vacunas que responden solamente a uno o unos pocos blancos, lo que puede causar que el tumor se adapte fácilmente al ataque (escape tumoral). Adicionalmente, no todos los tumores individuales expresan el mismo patrón de antígenos. Por lo tanto, una combinación de diferentes péptidos asociados a tumor asegura que cada tumor individual porte por lo menos algunos de los blancos. La composición se diseña de tal forma que se espera que cada tumor exprese diferentes antígenos y que la misma cubra diferentes vías independientes de crecimiento y mantenimiento tumoral. Por consiguiente, la vacuna se puede usar fácilmente “salido del estante” para una población mayor de pacientes. Esto significa que una preselección de pacientes a ser tratados con la vacuna puede estar restringida por el tipo de HLA, no requiere ninguna evaluación adicional de biomarcadores para expresión antigénica, pero aún así se asegura que los diferentes blancos se ataquen en forma simultánea por parte de la respuesta inmunológica inducida, lo que es importante para la eficacia (Banchereau y col., 2001; Walter y col., 2012).

Tal como se usa en la presente, el término “esqueleto” se refiere a una molécula que se une específicamente a un determinante (por ejemplo antigénico). En una forma de realización, un esqueleto es capaz de dirigir la entidad a la cual está unido (por ejemplo una (segunda) porción de unión antigénica) a un sitio blanco, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico (por ejemplo el complejo de un péptido con MHC, de acuerdo con la solicitud en mano). En otra forma de realización, un esqueleto es capaz de activar la señalización a través de su

antígeno blanco, por ejemplo un complejo de receptor de células T y antígeno. Los esqueletos incluyen a título enunciativo no taxativo, a anticuerpos y fragmentos de los mismos, dominios de unión a anticuerpo de un anticuerpo, que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena liviana de anticuerpo, proteínas de unión que comprenden por lo menos un motivo de repetición de anquirina y moléculas de unión a antígeno de dominio individual (SDAB), aptámeros, TCR (solubles) y células (modificadas) tales como células T alogénicas o autólogas. Para evaluar si una molécula es un esqueleto que se une a un blanco, se pueden llevar a cabo ensayos de unión.

Unión “específica” significa que el esqueleto se une al complejo de péptido y MHC de interés mejor que a otros complejos de péptido y MCH de origen natural, en una extensión en la que un esqueleto armado con una molécula activa que es capaz de matar a una célula que porta el blanco específico, no es capaz de matar otra célula sin el blanco específico, pero que presenta otro u otros complejos de péptido y MHC. La unión a otros complejos de péptido y MCH es irrelevante si el péptido del péptido-MHC de reacción cruzada no es de origen natural, es decir no deriva de el peptidoma humano de HLA. Los ensayos para evaluar la muerte de células blanco son bien conocidos en el arte. Los mismos se deben llevar a cabo usando células blanco (células primarias o líneas celulares) con presentación de péptido-MHC inalterada, o células cargadas con péptidos de forma que se alcanzan los niveles de origen natural de péptido-MHC.

Cada esqueleto puede comprender una marca que provee la capacidad de detección del esqueleto unido mediante la determinación de la presencia o ausencia de una señal provista por la marca. Por ejemplo, el esqueleto se puede marcar con una tinción fluorescente o cualquier otra molécula marcadora celular que sea aplicable. Dichas moléculas marcadoras son bien conocidas en el arte. Por ejemplo una marcación de fluorescencia, por ejemplo provista por un marcador fluorescente, puede proveer la visualización del aptámero unido por microscopía de fluorescencia o de barrido laser o citometría de flujo.

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

Para más información sobre esqueletos polipeptídicos véase por ejemplo la sección de antecedentes de WO 2014/071978A1 y las referencias que se citan en la misma.

La presente invención además se relaciona con aptámeros. Los aptámeros (véase por ejemplo WO 2014/191359 y la literatura que se cita en la misma) son moléculas de ácido nucleico cortas de simple hebra, que se pueden plegar en estructuras tridimensionales definidas y reconocer estructuras blanco específicas. Las mismas han aparecido como alternativas adecuadas para el desarrollo de terapias dirigidas. Los aptámeros han mostrado que se unen selectivamente a una variedad de complejos blancos con alta afinidad y especificidad.

En la última década se han identificado aptámeros que reconocen moléculas localizadas en la superficie celular y los mismos proveen medios para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas. Debido a que los aptámeros han demostrado poseer casi nada de toxicidad e inmunogenicidad, los mismos son candidatos promisorios para aplicaciones biomédicas. De hecho los aptámeros, por ejemplo los aptámeros que reconocen antígenos de membrana específicos de próstata, se han empleado exitosamente como terapias blanco y demostraron ser funcionales en xenoinjertos en modelos *in vivo*. Adicionalmente, se han identificado aptámeros que reconocen líneas celulares tumorales específicas.

Los aptámeros de ADN se pueden seleccionar para revelar propiedades de reconocimiento de amplio espectro para diversas células cancerosas, y particularmente los que derivan de tumores sólidos, mientras que las células sanas no tumorigénicas y primarias no son reconocidas. Si los aptámeros identificados reconocen no solo un subtipo específico de tumor sino que más bien interaccionan con una serie de tumores, esto hace a los aptámeros aplicables los llamados diagnósticos y terapéuticos de amplio espectro.

Además, la investigación del comportamiento de unión a células con citometría de flujo demostró que los aptámeros revelaron afinidades aparentes muy buenas que están dentro del rango nanomolar.

Los aptámeros son útiles para propósitos de diagnóstico y terapéutica. Además,

se ha podido demostrar que algunos de los aptámeros son captados por las células tumorales y por lo tanto pueden funcionar como vehículos moleculares para la administración dirigida de agentes anticáncer tales como ARNpi y las células tumorales.

Los aptámeros se pueden seleccionar contra complejos blancos tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprenden, preferiblemente consisten en, una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 114, de acuerdo con la invención en mano, con la molécula MHC, usando la técnica de Cell-SELEX (Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial).

Los péptidos de la presente invención se pueden usar para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos de MHC/péptido. Estos se pueden usar para terapia, direccionamiento de toxinas o sustancias radiactivas al tejido enfermo. Otro uso de estos anticuerpos puede ser el direccionamiento de radionúclidos al tejido enfermo para propósitos de adquisición de imágenes tales como PET. Este uso puede ayudar a detectar pequeñas metástasis o a determinar el tamaño y la localización precisa de los tejidos enfermos.

Por lo tanto, es un aspecto adicional de la invención proveer un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II complejada con un antígeno restringido a HLA, el donde el método comprende: inmunizar un mamífero no humano genéticamente modificado que comprende células que expresan dicha molécula de complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II con una forma soluble de una molécula MHC de clase I o II complejada con dicho antígeno restringido a HLA; aislar las moléculas de ARNm de las células que producen anticuerpo de dicho mamífero no humano; producir una biblioteca de exposición en fagos que muestra moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislar por lo menos un fago de dicha biblioteca de exposición en fagos, en donde dicho por lo menos un fago expone dicho anticuerpo que se une específicamente a dicha molécula de complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II complejada con dicho antígeno restringido a HLA.

Es un aspecto adicional de la invención proveer un anticuerpo que se

específicamente une a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II complejada con un antígeno restringido a HLA, en donde el anticuerpo preferiblemente es un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo quimérico.

Los métodos respectivos para producir dichos complejos de anticuerpo y cadena individual del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, así como otras herramientas para la producción de estos anticuerpos se divulgan en WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en publicaciones (Cohen y col., 2003a; Cohen y col., 2003b; Denkberg y col., 2003), que para los propósitos de la presente invención se incorporan en su totalidad todas explícitamente como referencias.

Preferiblemente, el anticuerpo se une con una afinidad de unión menor a 20 nanomolar, preferiblemente menor a 10 nanomolar, al complejo, que también se considera “específico” en el contexto de la presente invención.

La presente invención se relaciona con un péptido que comprende una secuencia que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288, o una variante de la misma que es por lo menos 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114 o una variante de la misma que induce reacción cruzada de células T con dicho péptido, en donde el mencionado péptido no es el polipéptido subyacente de longitud completa.

La presente invención además se relaciona con un péptido que comprende una secuencia que se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114 o una variante de la misma que es por lo menos 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288, en donde el mencionado péptido o variante tiene una longitud completa de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 14 aminoácidos.

La presente invención además se relaciona con los péptidos de acuerdo con la invención que tienen la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II.

La presente invención además se relaciona con los péptidos de acuerdo con la invención en donde el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de

aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114.

La presente invención además se relaciona con los péptidos de acuerdo con la invención, en donde el péptido está modificado (químicamente) y/o incluye enlaces no peptídicos.

La presente invención además se relaciona con los péptidos de acuerdo con la invención, en donde el péptido es parte de una proteína de fusión, en particular que comprende aminoácidos del extremo N terminal de la cadena invariante (II) asociada con antígeno de HLA-DR, o en donde el péptido se fusiona a (o en) un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico contra células dendríticas.

La presente invención además se relaciona con un ácido nucleico que codifica para los péptidos de acuerdo con la invención, con la condición de que el péptido no sea la proteína humana completo (total).

La presente invención además se relaciona con el ácido nucleico de acuerdo con la invención que es ADN, ADNc, PNA, ARN o combinaciones de los mismos.

La presente invención además se relaciona con un vector de expresión con capacidad de expresar un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La presente invención además se relaciona con un péptido de acuerdo con la presente invención, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión de acuerdo con la presente invención para usar en medicina, en particular en el tratamiento de RCC.

La presente invención además se relaciona con una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de expresión de acuerdo con la invención.

La presente invención además se relaciona con la célula huésped de acuerdo con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente una célula dendrítica.

La presente invención además se relaciona con un método para producir un péptido de acuerdo con la presente invención, en donde dicho método comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la presente invención, y aislar el péptido a partir de dicha célula huésped o su medio de cultivo.

La presente invención además se relaciona con el método de acuerdo con la presente invención, en donde el antígeno se carga en moléculas MHC de clase I o II expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno apropiada mediante el contacto de una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención además se relaciona con el método de acuerdo con la invención, en donde la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión con capacidad de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114 o dicha secuencia de aminoácidos variante.

La presente invención además se relaciona con células T activadas, producidas por el método de acuerdo con la presente invención, en donde dichas células T reconocen selectivamente una célula que expresa en forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención.

La presente invención además se relaciona con un método para matar células blanco en un paciente cuyas células blanco expresan en forma aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de células T de acuerdo con la presente invención.

La presente invención además se relaciona con el uso de cualquier péptido descrito, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, un vector de expresión de acuerdo con la presente invención, una célula de acuerdo con la presente invención, o un linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la presente invención como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La presente invención además se relaciona con un uso de acuerdo con la presente invención, en donde el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente invención además se relaciona con un uso de acuerdo con la invención, en donde el medicamento es una vacuna. La presente invención además se relaciona con un uso de acuerdo con la invención, en donde el medicamento es activo contra cáncer.

La presente invención además se relaciona con un uso de acuerdo con la

invención, en donde dichas células de cáncer son células de RCC o u otras células de tumor sólido o hematológico tales como cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon o rectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemias, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, y cáncer de esófago.

La presente invención además se relaciona con proteínas marcadoras particulares y biomarcadores basados en los péptidos de acuerdo con la presente invención, en la presente llamados “blancos” que se pueden usar en el diagnóstico y/o pronóstico de RCC. La presente invención también se relaciona con el uso de estos nuevos blancos para el tratamiento de cáncer.

El término “anticuerpo” o “anticuerpos” se usa en la presente en un sentido amplio e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. Además de las moléculas intactas o “completas” de inmunoglobulina, también se incluyen en el término “anticuerpos” los fragmentos (por ejemplo fragmentos CDR, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las moléculas de inmunoglobulina, siempre y cuando exhiban algunas de las propiedades deseadas (por ejemplo, unión específica de un (poli)péptido marcador de RCC, administración de una toxina a una célula que expresa un gen marcador de RCC en un nivel incrementado, y/o que inhibe la actividad de un (poli)péptido marcador de RCC de acuerdo con la invención.

Cuando sea posible, los anticuerpos de la invención se pueden adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden generar usando métodos bien conocidos. Las personas con experiencia en el arte comprenderán que los polipéptidos marcadores de RCC ya sean de longitud completa o bien fragmentos de los mismos se pueden usar para generar los anticuerpos de la invención. Un polipéptido a usar para generar un anticuerpo de la invención se pueden purificar parcialmente o totalmente a partir de una fuente natural, o se pueden producir usando técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un ADNc que codifica para un péptido de acuerdo con la presente invención, tal como un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114, o una variante o fragmento del mismo, se puede expresar en células procariotas (por ejemplo, bacterias) o células eucariotas (por ejemplo, células de levadura, insecto, o mamífero),

después de lo cual la proteína recombinante se puede purificar y usar para generar una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a un polipéptido marcador de RCC usado para generar el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Una persona con experiencia en el arte reconocerá que la generación de dos o más grupos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la posibilidad de obtener un anticuerpo con la especificidad y afinidad requeridas para su uso pretendido (por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica, adquisición de imágenes *in vivo*, terapia con inmunotoxina). Los anticuerpos se ensayan para ver su actividad deseada por métodos conocidos, de acuerdo con el propósito para el cual se van a usar los anticuerpos (por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para una guía adicional sobre la generación y ensayo de anticuerpos, véase, por ejemplo, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden ensayar en ensayos de ELISA o, transferencias Western, tinción inmunohistoquímica de cancer fijado en formalina o secciones de tejido congeladas. Después de su caracterización *in vitro* inicial, los anticuerpos pretendidos para uso terapéutico o diagnóstico *in vivo*, se ensayan de acuerdo con métodos de ensayo clínicos conocidos.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir; los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales en la presente específicamente incluyen anticuerpos “quiméricos” en donde una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando los mismos exhiban la actividad antagonista deseada (US 4.816.567, que se incorpora a la presente en su totalidad).

Los monoclonales monoclonales de la invención se pueden preparar usando métodos de hibridoma. En un método de hibridoma, típicamente se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado con un agente de inmunización para producir linfocitos T que producen o que tienen capacidad de producir anticuerpos que específicamente se unirán al agente de inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden elaborar por métodos de ADN recombinante, tales como los que se describen en US 4.816.567. El ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar fácilmente y secuenciar usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que tienen la capacidad de unirse específicamente a los genes que codifican para las cadenas pesada y liviana de anticuerpos murinos).

Los métodos *in vitro* son también adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, se puede llevar a cabo usando técnicas de rutina conocidas en el arte. Por ejemplo, la digestión se puede llevar a cabo usando papaína. Los ejemplos de digestión con papaína se describen en WO 94/29348 y US 4.342.566. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos Fab, cada uno con un sitio de unión individual de antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab')₂ y un fragmento pFc'.

Los fragmentos de anticuerpo, ya sea unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, eliminaciones, sustituciones, u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o residuos específicos de aminoácidos, con la condición de que la actividad del fragmento no esté significativamente alterada o dañada en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proveer algunas propiedades adicionales, tales como eliminar/agregar aminoácidos con capacidad de unión por disulfuro, incrementar su biolongoevidad, alterar sus características de secreción, etc. en cualquier caso, el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, tal como actividad de unión,

regulación de unión el dominio de unión, etc. Las regiones funcionales o activas del anticuerpo se pueden identificar por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido por expresión y ensayo del polipéptido expresado. Dichos métodos son fácilmente evidentes para las personas con experiencia en el arte y pueden incluir mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica para el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención además pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas no humanas humanizadas (por ejemplo, murinas) de anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab' u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en donde los residuos de una región determinante de complementaridad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de esqueleto Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor ni en las secuencias importadas de CDR o de esqueleto. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente por lo menos uno, y típicamente dos, dominio variables, en donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en el arte. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácido no humanos con frecuencia se denominan como residuos "importados", los

que típicamente se toman de un dominio variable “importado”. La humanización se puede llevar a cabo esencialmente por sustitución de secuencias de una o más CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (US 4.816.567), en donde sustancialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto en lugar de la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en donde algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR sustituyen a residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Se pueden emplear animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, ante su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota del gen de región de conexión de cadena pesada de anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal resulta en la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del arreglo génico de inmunoglobulinas de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos ante el desafío con antígenos. Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de exposición en fagos.

Los anticuerpos de la invención preferiblemente se administran a un sujeto en un transportador farmacéuticamente aceptable. Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para producir una formulación isotónica. Los ejemplos de transportador farmacéuticamente aceptable incluyen a solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución preferiblemente es entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8, y más preferiblemente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 7,5. Además los transportadores incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, en donde las matrices están en la forma de artículos formados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para las personas con experiencia en el arte que ciertos

transportadores pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración y la concentración de anticuerpo administrado.

Los anticuerpos se pueden administrar al sujeto, paciente, o célula por inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), o por otros métodos tales como infusión que asegura su administración al torrente sanguíneo en una forma eficaz. Los anticuerpos también se pueden administrar por rutas intratumorales o peritumorales, para ejercer efectos terapéuticos locales así como también sistémicos. La inyección local o intravenosa son las preferidas.

Las dosis eficaces y los cronogramas para administrar los anticuerpos pueden determinarse en forma empírica, y hacer dichas determinaciones está dentro de las capacidades del arte. Las personas con experiencia en el arte han de comprender que la dosificación de los anticuerpos que se deben administrar variará dependiendo de, por ejemplo, el sujeto que recibirá el anticuerpo, la ruta de administración, el tipo particular de anticuerpo usado y otros fármacos que se estén administrando. Una dosificación diaria típica del anticuerpo usado solo puede estar en el rango entre aproximadamente 1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) y hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores que se mencionaron previamente. Después de la administración de un anticuerpo, preferiblemente para tratar RCC, la eficacia del anticuerpo terapéutico puede evaluarse de varias formas bien conocidas para las personas con experiencia en el arte. Por ejemplo, se puede monitorear el tamaño, número, y/o distribución del cáncer en un sujeto que recibe un tratamiento usando técnicas de adquisición de imágenes tumorales estándares. Un anticuerpo administrado en forma terapéutica que arresta el crecimiento tumoral, resulta en la contracción del tumor, y/o previene el desarrollo de nuevos tumores, en comparación con el curso de la enfermedad que existiría en ausencia de administración de anticuerpo, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento de cáncer..

Es un aspecto adicional de la invención proveer un método para producir un receptor soluble de células T (TCR) que reconoce un complejo específico péptido-MHC. Dichos receptores solubles de células T se pueden generar a partir de clones de células T específicas, y su afinidad se puede incrementar por mutagénesis contra las regiones determinantes de complementariedad. Para el propósito de la selección del receptor de

células T, se puede usar exposición en fagos (US 2010/0113300, (Liddy y col., 2012)). Para el propósito de la estabilización de los receptores de células T durante la exposición en fagos y en el caso de su uso práctico como fármaco, la cadena alfa y la cadena beta se pueden conectar por ejemplo por puentes disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de células T de cadena individual), o por dominios de dimerización (Boulter y col., 2003; Card y col., 2004; Willcox y col., 1999). El receptor de células T se puede conectar a toxinas, fármacos, citoquinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191), y dominios que reclutan células efectoras tales como un dominio anti-CD3, etc., con el objetivo de ejecutar funciones particulares sobre células blanco. Más aún, el mismo se puede expresar en células T usadas para transferencia adoptiva. Se puede hallar información adicional en WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. Una combinación de TCR solubles se describe en WO 2012/056407A1. Otros métodos de producción se divulgan en WO 2013/057586A1.

Es un aspecto adicional de la invención proveer un TCR, por ejemplo un receptor de células T soluble (sTCR) que reconoce a un complejo específico de péptido y MHC como se divulga en la presente.

Además, los péptidos y/o los TCR o anticuerpos u otras moléculas de unión de la presente invención se pueden usar para verificar un diagnóstico patológico de un cáncer en base a la muestra de biopsia.

Los anticuerpos o TCRs también se pueden usar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionucleótido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de forma que el tumor se pueda localizar usando inmunoscintileo. En una forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más blancos de una proteína que se elige del grupo que consiste en las proteínas que se mencionaron previamente, y el valor de afinidad (K_d) es menor a $1 \times 10\mu\text{M}$.

Los anticuerpos para uso diagnóstico se pueden marcar con sondas adecuadas para la detección por diversos métodos de adquisición de imágenes. Los métodos para la detección de sondas incluyen, a título enunciativo no taxativo, a microscopia de fluorescencia, óptica, confocal y electrónica; adquisición de imágenes y espectroscopia

de resonancia magnética; fluoroscopia, tomografía computada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, a título enunciativo no taxativo, a fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos que emiten positrones. Adicionalmente, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y pueden ser detectables por más de uno de los métodos listados. Estos anticuerpos se pueden marcar directamente o indirectamente son dichas sondas. La unión de sondas a los anticuerpos incluye unión covalente de la sonda, incorporación de la sonda en el anticuerpo, y la unión covalente de un compuesto quelante para la unión de la sonda, entre otros métodos bien reconocidos en el arte. Para inmunohistoquímica, la muestra de tejido enfermo puede ser fresca o congelada o se puede embeber en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina. La sección fijada o embebida que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, en donde el anticuerpo se usa para detectar la expresión de las proteínas *in situ*.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método *in vitro* para producir células T activadas, en donde el método comprende poner en contacto *in vitro* células T con moléculas de MHC humanas cargadas con antígeno expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno apropiada durante un periodo de tiempo suficiente para activar la célula T de una forma específica de antígeno, en donde el antígeno es un péptido de acuerdo con la invención. Preferiblemente se usa una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

Preferiblemente, la célula de mamífero carece o tiene un nivel o función reducida del transportador peptídico TAP. Las células adecuadas que carecen del transportador peptídico TAP incluyen a T2, RMA-S y células de *Drosophila*. El TAP es el transportador asociado con el procesamiento de antígenos.

La línea celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE.UU. bajo número de catálogo CRL 1992; la línea celular de *Drosophila* Schneider 2 está disponible en la ATCC bajo número de catálogo CRL 19863; la línea célula de ratón RMA-S se describe en Ljunggren y col. (Ljunggren y Karre, 1985).

Preferiblemente, antes de la transfección, la célula huésped no expresa sustancialmente moléculas de MHC de clase I. También se prefiere que la célula estimuladora exprese una molécula importante para proveer una señal coestimuladora para las células T tales como cualquiera de B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácido nucleico de numerosas moléculas de MHC de clase I y de moléculas coestimuladoras están públicamente disponibles en las bases de datos GenBank y EMBL.

En el caso de un epítipo de MHC de clase I usado como antígeno, las células T son células T positivas para CD8.

Si una célula presentadora de antígeno se transfecta para expresar dicho epítipo, preferiblemente la célula comprende un vector de expresión con capacidad de expresar un péptido que contiene las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 114 y/o SEQ ID NO: 115 a SEQ ID NO: 151, o una secuencia de aminoácidos variante de las mismas.

Pueden usarse varios otros métodos para generar células T *in vitro*. Por ejemplo, se pueden usar linfocitos autólogos infiltrantes de tumor en la generación de CTL. Plebanski y col. (Plebanski y col., 1995) hicieron uso de linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) en la preparación de células T. Adicionalmente, es posible la producción de células T autólogas por pulsos de células dendríticas con péptido o polipéptido, o a través de infección con virus recombinante. También, se pueden usar células B en la producción de células T autólogas. Además, se pueden usar macrófagos pulsados con péptido o polipéptido, o infectados con virus recombinante, en la preparación de células T autólogas. S. Walter y col. (Walter y col., 2003) describen el cebado *in vitro* de células T mediante el uso de células presentadora de antígenos artificiales (aAPCs), que también son un modo adecuado para generar células T contra el péptido de elección. En la presente invención, se generaron aAPCs mediante el acoplamiento de complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas poliestireno (microesferas) por bioquímica de biotina:estreptavidina. Este sistema permite el control exacto de la densidad de MHC sobre las aAPCs, lo que permite la producción selectiva de respuestas de células T específicas de antígeno de alta o de baja avidéz con alta eficiencia a partir de muestras de sangre. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPCs deben portar

otras proteínas con actividad coestimuladora como anticuerpos anti-CD28 acoplados a su superficie. Adicionalmente dichos sistemas basados en aAPC con frecuencia requieren el agregado de factores solubles apropiados, por ejemplo, citoquinas, como interleuquina 12.

También se pueden usar células alogénicas también en la preparación de células T y se describe un método en detalle en WO 97/26328, que se incorpora a la presente como referencia. Por ejemplo, además de las células de *Drosophila* y las células T2, se pueden usar otras células para presentar antígenos tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, células bacteria, levadura, y células blanco infectadas con vacuna. Además se pueden usar virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta y col. (Porta y col., 1994) que describe el desarrollo de virus mosaico de guisante pinto como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos foráneos.

Las células T activadas que se direccionan contra los péptidos de la invención son útiles en terapia. Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención provee células T activadas que se pueden obtener mediante los métodos previos de la invención.

Las células T activadas, que se producen por el método previo, reconocerán selectivamente a una célula que expresa en forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO 114.

Preferiblemente, la célula T reconoce la célula por interacción a través de su TCR con el complejo HLA/péptido (por ejemplo, unión). Las células T son útiles en un método para matar células blanco en un paciente cuyas células blanco expresan en forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención en donde el paciente se administra con una cantidad eficaz de las células T activadas. Las células T que se administran al paciente pueden derivar del paciente y activarse como se describió previamente (es decir las mismas son células T autólogas). Como alternativa, las células T no son del paciente sino que son de otro individuo. Por supuesto, es preferible que el individuo sea un individuo sano. Mediante el término "individuo sano" los inventores designan al individuo con buena salud general, preferiblemente con un sistema inmunológico competente y, más preferiblemente, no sufriendo de ninguna enfermedad que se pueda probar o detectar fácilmente.

In vivo, las células blanco para las células T positivas para CD8 de acuerdo con la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresa MHC de clase II) y/o células de estroma que rodean al tumor (células tumorales) (que a veces también expresan la MHC de clase II; (Dengjel y col., 2006)).

Las células T de la presente invención se pueden usar como ingredientes activos de una composición terapéutica. Por consiguiente, la invención también provee un método para matar células blanco en un paciente cuyas células blanco expresan en forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de células T como se definió previamente.

Mediante el término “aberrantemente expresado” los inventores también designan al polipéptido que se sobreexpresa en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen es silente en el tejido del que deriva el tumor, pero que se expresa en el tumor. Mediante el término “sobreexpresado” los inventores designan al polipéptido que está presente a un nivel de por lo menos 1,2 veces que el presente en tejido normal; preferiblemente por lo menos 2 veces, y más preferiblemente por lo menos 5 veces o 10 veces comparado con el nivel presente en tejido normal.

Las células T se pueden obtener por métodos conocidos en el arte, por ejemplo los que se describieron previamente. Los protocolos para esta denominada transferencia adoptiva de células T son bien conocidos en el arte. Se pueden hallar revisiones en: Gattinoni y col. y Morgan y col. (Gattinoni y col., 2006; Morgan y col., 2006).

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de los péptidos complejados con MHC para generar un receptor de células T cuyo ácido nucleico se clona y se introduce en una célula huésped, preferiblemente una célula T. Esta célula T modificada por ingeniería se puede transferir luego a un paciente para terapia de cáncer.

Cualquier molécula de la invención, es decir el péptido, ácido nucleico, anticuerpo, vector de expresión, célula, célula T activada, receptor de células T o el ácido nucleico que los codifica, es útil para el tratamiento de trastornos, caracterizado por células que escapan a las respuestas inmunológicas. Por lo tanto se puede usar cualquier molécula de la presente invención como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La

molécula se puede usar por sí misma o combinada con otra u otras moléculas de la invención o una o más moléculas conocidas.

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 una solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y
- (c) opcionalmente, (i) instrucciones de uso de la solución o (ii) de la reconstitución y/o del 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 (vii) 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 contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envase 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 diversos materiales 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. Se puede utilizar una bomba de infusión para la administración.

Debido a que los péptidos de la invención se aislaron de RCC, el medicamento de la invención preferiblemente se usa para tratar RCC.

La presente invención se relaciona con, además, 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 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 sea una vacuna. El método también se puede adaptar para producir clones de linfocitos T para aplicaciones destinadas a la obtención del producto acabado como el aislamiento de los TCR, o 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” designa un grupo o conjunto de péptidos que han sido preseleccionados por su inmunogenicidad y sobrerepresentación en un tipo concreto de tumor, y que puede adquirir la forma de una base de datos o una unidad de almacenamiento real, por ejemplo. 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 base de datos o de unidad de almacenamiento real) está compuesto de péptidos asociados a tumor que se sobreexpresan mucho en el tejido tumoral de pacientes con RCC con diversos alelos de HLA-A, HLA-B y HLA-C. El mismo puede contener péptidos de MHC de clase I y MHC de clase II o péptidos elongados de MHC de clase I. Además de los péptidos asociados a tumor recolectados de diferentes tejidos con

RCC, el depósito puede contener péptidos marcados HLA-A*02 y HLA-A*24. Estos péptidos permiten la comparación de la magnitud de la inmunidad de células T inducidas por TUMAP de una forma cuantitativa y por lo tanto permiten obtener importantes conclusiones sobre la capacidad de la vacuna para producir respuestas antitumorales. Segundo, los mismos funcionan como péptidos control positivos importantes derivados de un “no auto” antígeno, en el caso de que no se observe una respuesta de células T inducida por vacuna contra los TUMAP derivados de “auto” antígenos en un paciente. Y tercero, los mismos pueden permitir obtener conclusiones con respecto al estado de inmunocompetencia del paciente.

Los TUMAP para el depósito se identifican mediante el uso de estrategias de genómica funcional integrada que combinan análisis de expresión génica, espectrometría de masa, e inmunología de células T (XPresident®). La estrategia asegura que solo los TUMAP verdaderamente presentes en un alto porcentaje de los tumores, pero no expresados, o expresados mínimamente en tejido normal, se elijan para los análisis adicionales. Para la selección inicial de péptidos, se analizaron muestras de RCC de pacientes y sangre de donantes sanos en una estrategia de a pasos:

1. Se identificaron ligandos de HLA del material maligno por espectrometría de masa
2. Se usó análisis de expresión de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) de genoma completo para identificar genes sobreexpresados en el tejido maligno (RCC) en comparación con un rango de órganos y tejidos normales
3. Se compararon los ligandos de HLA identificados con datos de expresión génica. Los péptidos sobre presentados o presentados selectivamente en tejido tumoral, preferiblemente codificados por genes selectivamente expresados o sobreexpresados según la detección en el paso 2 se consideraron TUMAP candidatos apropiados para una vacuna multipeptídica.
4. Se llevó a cabo una búsqueda en la literatura con el objetivo de identificar evidencia adicional que apoye la relevancia de los péptidos identificados como TUMAP.
5. La relevancia de la sobreexpresión a nivel del ARNm se confirmó por una nueva detección de TUMAP seleccionados a partir del paso 3 en tejido tumoral y por falta

de detección (o detección infrecuente) en tejidos sanos.

6. Con el objetivo de evaluar si pueden ser posible respuestas de células T *in vivo* mediante los péptidos seleccionados, se llevaron a cabo ensayos de inmunogenicidad *in vitro* usando células T humanas de donantes sanos así como de pacientes con RCC.

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 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 multipeptídicos de composición fija que se están desarrollando el archivo permite un emparejamiento significativamente mejor de la expresión real de los antígenos del tumor con la vacuna. Se puede usar un péptido o combinaciones de varios péptidos «estándar» para cada paciente como parte de una estrategia multidiana. 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 vacuna en función de su idoneidad para cada paciente de acuerdo con el método acorde con la presente invención como se describe en la presente, o como 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 del archivo y exclusivos del pacientes (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 del archivo (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 que la muestra tumoral para identificar proteínas que se sobreexpresen o se expresen de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con 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, o como alternativa, a la selección de péptidos con el modelo almacenamiento (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 (a1) 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 correspondiente tejido normal se pueden secuenciar mediante secuenciación hologenómica: Para descubrir mutaciones que no sean sinónimas en las regiones

codificadoras de proteínas de los genes, se extraen el ADN y el ARN genómicos de tejidos tumorales y el ADN genómico germinal normal y no mutado se extrae 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 comprobar 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 mediante la comparación 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 (base de datos), y los TUMAP candidatos que posean la inmunogenicidad adecuada se seleccionan 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 mediante el método ante 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 del archivo (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 seleccionados los péptidos para una vacuna en base a péptido personalizado, se produce la vacuna. La vacuna preferentemente es una formulación líquida que contiene los péptidos disueltos entre 20 y 40% de DMSO, preferiblemente entre aproximadamente 30 y 35% de DMSO, tal como aproximadamente DMSO al 33%.

Cada péptido se disuelve en DMSO antes de formar parte en el 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 μ m. 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 μ l de solución que contiene 0,578 mg de cada péptido. De los cuales 500 μ l (aprox. 400 μ g por péptido) se aplicarán con la inyección intradérmica.

Además de ser útiles para tratar cáncer, los péptidos de la presente invención también son útiles para diagnóstico. Debido a que los péptidos se generaron a partir de células de RCC y debido a que se determinó que estos péptidos no están presentes o lo están en niveles inferiores en tejidos normales, estos péptidos se pueden usar para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los péptidos reivindicados en biopsias de tejido en muestras completas puede ayudar a un patólogo a diagnosticar un cáncer. La detección de ciertos péptidos por medio de anticuerpos, espectrometría de masa u otros métodos conocidos en el arte puede indicar al patólogo que la muestra de tejido es maligna o inflamada o enferma en forma general, o se puede usar como un biomarcador para RCC. La presencia de grupos de péptidos puede permitir la clasificación o subclasificación de tejidos enfermos.

La detección de péptidos en muestras de tejido enfermo puede permitir la decisión acerca del beneficio de terapias que implican el sistema inmunológico, especialmente si

se sabe o se espera que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo bien descrito mediante el cual las células infectadas o malignas escapan de la vigilancia inmune. Por consiguiente, la presencia de péptidos muestra que este mecanismo no es usado por las células analizadas.

Los péptidos de la presente invención podrían usarse para analizar las respuestas de linfocitos contra esos péptidos tales como las respuestas de células T o las respuestas de anticuerpo contra el péptido o el péptido complejo a las moléculas MHC. Estas respuestas de linfocitos se pueden usar como marcadores pronósticos para una decisión sobre pasos adicionales de terapia. Estas respuestas también se pueden usar como marcadores sustitutos de respuesta en estrategias de inmunoterapia que tienen el objetivo de inducir respuestas de linfocitos por diferentes medios, por ejemplo vacunación de proteína, ácidos nucleicos, materiales autólogos, transferencia adoptiva de linfocitos. En las estrategias de terapia génica, las respuestas de linfocitos contra los péptidos pueden ser consideradas en la evaluación de efectos secundarios. El monitoreo de respuestas de linfocitos también podría ser una herramienta de valor para los exámenes de seguimiento de terapias de trasplante, por ejemplo para la detección de enfermedades de injerto versus huésped y huésped versus injerto.

La presente invención se describirá ahora mediante los siguientes ejemplos que describen las formas de realización preferidas de la invención, y en referencia a las figuras acompañantes, sin embargo, sin limitar la invención. Para los propósitos de la presente invención, todas las referencias, tal como se citan en la presente, se incorporan como referencia en sus totalidad.

FIGURAS

Las Figuras 1A a N muestran la sobre presentación de diversos péptidos en tejidos normales y en RCC. Figura 1A) Gen: SLC17A3, Péptido: ALIVSLPYL (SEQ ID NO.: 1) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas adrenales, 2 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 muestras de colon, 1 ovario, 1 duodeno 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 corazones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 nódulo linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 glándula pituitaria, 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, 12 riñones, 18 RCC. El péptido también se halló en cáncer de hígado (no mostrado). Figura 1B) Gen: SOGA2, Péptido: YLEEDVYQL (SEQ ID NO.: 128) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas adrenales, 2 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 muestras de colon, 1 ovario, 1 duodeno 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 corazones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 nódulo linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas, 12 riñones, 18 RCC. El péptido también se halló en cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de estómago, y cáncer de pulmón (no mostrado). Figura 1C) Gen: SEMA5B, Péptido: ALDPSGNQLI (SEQ ID NO.: 12) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposos, 3 glándulas adrenales, 2 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 muestras de colon, 1 ovario, 1 duodeno 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 corazones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 nódulo linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas, 12 riñones, 18 RCC. El péptido también se halló en cáncer de ovario, cáncer de cerebro, y cáncer de pulmón (no mostrado). Figura 1D) Gen: RGS5, Péptido: GLASFKSFL (SEQ ID NO.: 8) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposos, 3 glándulas adrenales, 2 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 muestras de colon, 1 ovario, 1 duodeno 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 corazones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 nódulo linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas, 12 riñones, 18 RCC. El péptido también se halló en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, cáncer de estómago y cáncer de pulmón (no mostrado). Figura 1E) Gen: SLC16A3, Péptido: VVDEGPTGV

(SEQ ID NO.: 135) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 línea celular leucocítica, 5 tejidos normales (3 pulmones, 1 nódulo linfático, 1 bazo), 77 tejidos cancerosos (2 cánceres de cerebro, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 1 cáncer de esófago, 10 cáncer de riñón, 1 leucemia, 1 cáncer de hígado, 35 cánceres de pulmón, 12 cánceres de ovario, 8 cánceres pancreáticos, 5 cánceres de estómagos). Las muestras sin presentación peptídica no se muestran. El panel de tejido normal (sano) ensayado fue el mismo que en la Figura 1A-D. Figura 1F) Gen: ESM1, Péptido: LLVPAHLVAA (SEQ ID No.: 25) – Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas adrenales, 2 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 muestras de colon, 1 duodeno, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 corazones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 nódulo linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas, 12 riñones, 18 RCC. El péptido también se halló en cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón y cáncer útero (no mostrado). Figura 1G) Gen: ARHGAP42, Péptido: ILIKHLVKV (SEQ ID NO.: 15) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 línea celular (1 melanoma), 17 tejidos cancerosos (1 cáncer de colon, 5 cánceres de riñón, 1 cáncer de hígado, 3 cánceres de pulmón, 4 cánceres de nódulo linfático, 1 cáncer de testículos, 2 cánceres de útero). Figura 1H) Gen: HTR, Péptido: FIADVVEKI (SEQ ID NO.: 33) - Tejidos de izquierda a derecha: 16 tejidos cancerosos (1 cáncer de cerebro, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de esófago, 3 cánceres de riñón, 1 cáncer de leucemia leucocítica, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de nódulo linfático, 2 cánceres de ovario, 1 cáncer de páncreas). Figura 1I) Gen: HSF2B, Péptido: VLLDTILQL (SEQ ID NO.: 38) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 benigno (cáncer de riñón), 3 líneas celulares (1 páncreas, 1 pleura, 1 próstata), 1 de otra enfermedad (1 piel), 9 tejidos normales (1 pulmón, 1 nódulo linfático, 2 placentas, 1 intestino delgado, 3 bazos, 1 glándula tiroides), 67 tejidos cancerosos (1 cáncer de ducto biliar, 5 cánceres de cerebro, 2 cánceres de mama, 2 cánceres de esófago, 2 cánceres de vesícula biliar, 4 cánceres de riñón, 7 cánceres de leucemia leucocítica, 3 cánceres de hígado, 16 cánceres de pulmón, 5 cánceres de nódulo linfático, 1 cáncer de células mieloides, 9 cánceres de ovario, 1 cáncer de páncreas, 1 cáncer de

recto, 5 cánceres de piel, 2 cánceres de la vejiga urinaria, 1 cáncer de útero). Figura 1J) Gen: TRAM1, Péptido: YLLNLNHLGL (SEQ ID NO.: 39) - Tejidos de izquierda a derecha: 2 líneas celulares (1 riñón, 1 páncreas), 1 tejido normal (1 pulmón), 19 tejidos cancerosos (1 cáncer de mama, 2 cánceres de riñón, 3 cánceres de leucemia leucocítica, 2 cánceres de hígado, 7 cánceres de pulmón, 1 cáncer de nódulo linfático, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de recto, 1 cáncer de la vejiga urinaria). Figura 1K) Gen: PXDNL, Péptido: SILDAVQRV (SEQ ID NO.: 52) - Tejidos de izquierda a derecha: 23 tejidos cancerosos (3 cánceres de cerebro, 4 cánceres de mama, 3 cánceres de riñón, 8 cánceres de pulmón, 2 cánceres de ovario, 1 cáncer de páncreas, 1 cáncer de piel, 1 cáncer de útero). Figura 1L) Gen: THY1, Péptido: SLLQATDFMSL (SEQ ID NO.: 82) - Tejidos de izquierda a derecha: 11 líneas celulares (11 líneas celulares de páncreas), 4 tejidos normales (1 riñón, 1 nódulo linfático, 1 placenta, 1 tráquea), 36 tejidos cancerosos (1 cáncer de ducto biliar, 5 cánceres de cerebro, 3 cánceres de mama, 4 cánceres de colon, 1 cáncer de esófago, 3 cánceres de riñón, 1 cáncer de hígado, 9 cánceres de pulmón, 1 cáncer de nódulo linfático, 1 cáncer de ovario, 2 cánceres de páncreas, 1 cáncer de recto, 2 cánceres de piel, 1 cáncer de la vejiga urinaria, 1 cáncer de útero). Figura 1M) Gen: ARRDC3, Péptido: KIPPVSPSI (SEQ ID NO.: 98) - Tejidos de izquierda a derecha: 2 líneas celulares (2 riñón), 4 tejidos normales (1 glándula adrenal, 1 pulmón, 1 nódulo linfático, 1 placenta), 47 tejidos cancerosos (4 cánceres de cerebro, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de vesícula biliar, 5 cánceres de riñón, 1 cáncer de leucemia leucocítica, 5 cánceres de hígado, 12 cánceres de pulmón, 2 cánceres de nódulo linfático, 4 cánceres de ovario, 3 cánceres de próstata, 2 cánceres de piel, 6 cánceres de útero). Figura 1N) Gen: TIMP1, Péptido: KLQDGLLHI (SEQ ID NO.: 103) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 línea celular (1 células sanguíneas), 29 tejidos cancerosos (2 cánceres de cerebro, 5 cánceres de colon, 3 cánceres de riñón, 1 cáncer de hígado, 4 cánceres de pulmón, 2 cánceres de nódulo linfático, 3 cánceres de ovario, 1 cáncer de páncreas, 1 cáncer de recto, 6 cánceres de piel, 1 cáncer de testículo).

Las Figuras 2A) a D) muestran ejemplos de perfiles de expresión (expresión relativa en comparación con normal riñón) de genes fuente de la presente invención que están altamente sobreexpresadas o exclusivamente expresadas en RCC en un panel de

tejidos normales y 35 muestras de RCC. Tejidos de izquierda a derecha: glándula adrenal, arteria, médula ósea, cerebro (completo), mamas, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, nódulo linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cérvix uterino, útero, vena, 23 muestras normales de riñón, 35 muestras de RCC. Figura 2A) GAL3ST1; Figura 2B) EGLN3; Figura 2C) APOL1; y Figura 2D) MET.

Las Figuras 3A-F muestran datos ejemplificativos de inmunogenicidad: resultados de citometría de flujo después de tinción multimérica específica de péptido, como resultado de respuestas a células T CD8+ *in vitro* específicas de péptido de un donante sano HLA-A*02+. Las células T CD8+ se cebaron usando APC artificiales recubiertos con mAb anti-CD28 y HLA-A*02 en complejo con el péptido SeqID No 20 (C, panel izquierdo), el péptido de SeqID No 34 (D, panel izquierdo), el péptido de SeqID No 1 (E, panel izquierdo) o el péptido de SeqID No 15 (F, panel izquierdo) respectivamente. Después de tres ciclos de estimulación, la detección de las células reactivas a péptido se llevó a cabo mediante tinción multimérica 2D con A*02/SeqID No 20 (C), A*02/SeqID No 34 (D), A*02/SeqID No 1 (E) o A*02/SeqID No 15 (F). Los paneles derechos (C, D, E y F) muestran la tinción control de células estimuladas con complejos irrelevantes A*02/péptido. Las células individuales viables se seleccionaron como linfocitos CD8+. Las restricciones bulianas ayudaron a excluir los eventos falsos positivos detectados con multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de las células específicas positivas a multímeros entre los linfocitos CD8+.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Identificación y cuantificación de péptidos asociados a tumor presentados sobre la superficie celular

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes se obtuvieron de BioServe (Beltsville, MD, EE.UU.); Hospital Universitario de Múnich; Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto (KPUM); Hospital Universitario de Tübingen.

Los tejidos normales (sanos) se obtuvieron de Bio-Options Inc., CA, EE.UU.; BioServe, Beltsville, MD, EE.UU.; Capital BioScience Inc., Rockville, MD, EE.UU.; Geneticist Inc., Glendale, CA, EE.UU.; Hospital Universitario de Ginebra; Hospital Universitario de Heidelberg; Hospital Universitario de Kyoto Universidad de Medicina de la Prefectura (KPUM); Hospital Universitario de Múnich; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, EE.UU.; Hospital Universitario de Tübingen.

Los consentimientos informados escritos de los pacientes se dieron antes de la cirugía o autopsia. Los tejidos se congelaron inmediatamente después de la escisión y se almacenaron hasta el aislamiento de los TUMAP a -70°C o inferior.

Aislamiento de péptidos HLA a partir de muestras de tejido

Los agrupamientos de péptido HLA de las muestras de tejido congeladas se obtuvieron por precipitación inmunológica a partir de tejidos sólidos de acuerdo con un protocolo levemente modificado (Falk y col., 1991; Seeger y col., 1999) usando el anticuerpo BB7.2 específico contra HLA-A*02, el anticuerpo W6/32 específico contra HLA-A, -B, -C, tratamiento con sefarsa activada con CNBr, tratamiento ácido, y ultrafiltración.

Análisis por espectrometría de masa

Los agrupamientos de péptido HLA obtenidos se separaron de acuerdo con su hidrofobicidad por cromatografía de fase reversa (nanoAcquity UPLC system, Waters) y los péptidos eluatos se analizaron con espectrómetros de masa LTQ-velos e híbrido de fusión (ThermoElectron) equipados con una fuente de ESI. Los agrupamientos de péptidos se sembraron directamente en columna microcapilar analítica de sílice fusionado ($75\text{ }\mu\text{m i.d.} \times 250\text{ mm}$) empaquetando material de fase reversa de C18 $1,7\text{ }\mu\text{m}$ (Waters) aplicando una velocidad de flujo de 400 nl por minuto . Subsiguientemente, los péptidos se separaron usando un gradiente binario de dos pasos de 180 minutos entre 10% y 33% de B a una velocidad de flujo de 300 nl por minuto . El gradiente estuvo compuesto de Solvente A ($0,1\%$ de ácido fórmico en agua) y solvente B ($0,1\%$ de ácido fórmico en acetonitrilo). Se usó una columna capilar de vidrio recubierto con oro (PicoTip, New Objective) para la introducción en la fuente nanoESI. Los espectrómetros de masa LTQ-Orbitrap se operaron en el modo dependiente de datos usando una estrategia TOP5.

Brevemente, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de precisión de alta masa en el Orbitrap ($R = 30\,000$), que fue seguido por barridos MS/MS también en el Orbitrap ($R = 7500$) sobre los 5 precursores más abundantes con exclusión dinámica de iones previamente seleccionados. Los espectros de masa en tándem se interpretaron por SEQUEST y control manual adicional. La secuencia de los péptidos identificados se aseguró por comparación del patrón de fragmentación peptídica natural generada con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia artificial de secuencia idéntica.

La cuantificación relativa de LC-MS libre de marca se llevó a cabo por conteo iónico, es decir por extracción y análisis de características de LC-MS (Mueller y col., 2007). El método asume que la señal peptídica de LC-MS se correlaciona con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron adicionalmente por deconvolución de estado de carga y alineamiento de tiempo de retención (Mueller y col., 2008; Sturm y col., 2008). Finalmente, todas las características de LC-MS se referenciaron en forma cruzada con los resultados de identificación de secuencia para combinar los datos cuantitativos de diferentes muestras y tejidos con los perfiles de presentación peptídica. Los datos cuantitativos se normalizaron de forma a dos niveles de acuerdo con la tendencia central para tener en cuenta la variación dentro de las réplicas técnicas y biológicas. Por consiguiente, cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Además, todos los datos cuantitativos adquiridos para los péptidos candidatos se revisaron en forma manual para asegurar la consistencia de los datos y para verificar la precisión del análisis automático. Para cada péptido, se calculó un perfil de presentación que muestra la presentación media de muestras así como las variaciones de las réplicas. Los perfiles juxtaponen las muestras de cáncer con una línea basal de muestras de tejido normal. Los perfiles de presentación de ejemplos de péptidos sobre presentados se muestran en la Figura 1. Las puntuaciones de presentación para ejemplos de péptidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Puntuaciones de presentación. La tabla lista péptidos que están muy altamente sobreexpresados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (+++), altamente sobreexpresados en tumores en comparación con un panel de

tejidos normales (++) o sobreexpresados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (+).

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación Peptídica
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVT	+++
3	RLLGEVQAL	+++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	+++
6	VLFEISKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	+++
9	ILLQKPDSV	+++
10	KLLQNNYGL	+
11	FIQTEAPKEV	+++
12	ALDPGSGNQLI	+++
13	KIMAQILTV	+
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	+++
16	FMPEELPQL	+++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	+
20	AVANTTFTV	+++
21	RLIQGDQILSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	++
26	SLMEILYTL	+++
27	SLSDLLVSL	++
28	FIADLVVGL	++

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación Peptídica
29	ILLDLEQAL	+
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+
32	FLAGGIRGSGA	+++
33	FIADVVEKI	+++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	+++
36	SLFGKKYIL	+++
37	VLAPVILML	+++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLQI	++
41	GLLCTLQKL	+
42	VILDTGTIQL	+++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+
45	ALLGIPLTL	++
47	TLAEVRAVQEI	+
48	VVASNIMEV	+++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	+
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	+++
55	YLALILPVL	+++
56	ILMDFSNSM	+
57	SLQKEILYL	+++
58	FLVDFEQSHL	++
60	ILWKDIEYV	+++

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación Peptídica
61	SLMGILLRI	+++
62	VLGPAFLVQL	+++
66	TLLKTIKIV	++
67	LLDVLAPLV	+
68	YVLTQPPSV	+++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	+
72	YSLEKVFGI	+
73	GLDGIPFTV	++
74	GLFHKQVTV	+
75	FLIKSINLV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	+
79	ALADIVWRA	+
80	KLASMLET	+
83	IQWSIVPEV	++
86	GLLQGKLALL	+
88	TLAELHISL	+
89	SLLLAVTEV	+
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	+
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++
94	ILHHKVYDL	+
96	TLAETLVNL	+
97	TLISELVQA	+
98	KIPPVSPSI	+++
99	GLAPHLEQI	+

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación Peptídica
100	KLNVAPLAV	+
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+
103	KLQDGLLHI	+++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	++
106	VLMDLKALL	+
107	VLMDLKALLL	++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	+
110	LLDLHSYLL	+
111	TLLETEMLL	+++
112	LLFDHLEPIEL	+
113	SLFDWNVKL	++
114	ALAVNISAA	++
115	LLDPKTIFL	+++
116	GLVDIMVHL	+++
117	VLFGELPAL	+++
118	FLNAIETAL	+++
119	RLHDENILL	+++
120	GLAGDNIYL	+++
121	ALLRTVVSV	++
122	SLDPSSPQV	++
123	YVDPVITSI	++
124	ILSPLSVAL	+
125	KLDPTKTTL	+++
126	KIQEILTQV	+++
127	VLAPLFVYL	++

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación Peptídica
128	YLEEDVYQL	+++
129	VLAPRVLRA	++
130	ALPTVLVGV	++
131	VMAGDIYSV	++
132	SVASTITGV	++
133	QLIDYERQL	++
134	VADKIHSV	+++
135	VVDEGPTGV	+++
136	YQDPHSTAV	++
137	TLVAIVGV	++
138	SLDTLMTYV	++
139	ILNVDGLIGV	++
140	SLANNVTSV	++
141	LLVDDSLHTV	+++
143	ALFVRLLALA	++
145	SLHFLILYV	+
150	TLMPNINKL	+++
151	YMYEGPAPRI	+++

EJEMPLO 2

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

La sobre presentación o presentación específica de un péptido sobre las células tumorales en comparación con las células normales es suficiente para su utilidad en inmunoterapia, y algunos péptidos son específicos de tumor a pesar de que su proteína fuente esté también en tejidos normales. Aún así, el perfil de expresión de ARNm agrega un nivel adicional de seguridad en la selección de péptidos blanco para inmunoterapia. Especialmente para las opciones terapéuticas con alto riesgo de seguridad, tales como los TCR de afinidad madurada, el péptido blanco ideal derivará de una proteína que es única para el tumor y que no se halla en los tejidos normales.

Fuentes de ARN y preparación

Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas como se indicó precedentemente (véase Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se criogenizaron 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 purificaron 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, Amsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, CA, 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 de microarreglos

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, CA, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, se sintetizó ADNc bicatenario a partir de entre 5 y 8 µg de ARN total 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, New York, 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. Los ejemplos de perfiles de expresión de genes fuente de la presente invención que se sobreexpresan en alta cantidad o se expresan en forma exclusiva en RCC se muestran en la Figura 2. Las puntuaciones de expresión para otros ejemplos de genes se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Puntuaciones de expresión. La tabla lista péptidos de genes que están muy altamente sobreexpresados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (+++), altamente sobreexpresados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (++) o sobreexpresados en tumores en comparación con un panel de tejidos normales (+).

Seq ID NO	Nombre de gen	secuencia	Expresión de gen
1	SLC17A3	ALIVSLPYL	++
2	HSF4	ILWREVVT	++
3	HSF4	RLLGEVQAL	++
6	ATP11A	VLFEISKTV	+
7	EGLN3	FLLSLIDRL	++
18	ACLY	YVLDLAAKV	+
28	ENO1,ENO2,ENO3	FIADLVVGL	+
35	ANGPTL4	VLHSLQTQL	++
37	ABCC3	VLAPVILML	+
40	IVNS1ABP	YIQEHLLQI	+
50	ITGA3	SLSDHIVLL	+
51	ITGA3	NLWPMILTL	+
55	SLC16A4	YLALILPVL	+
59	TGFBI	SLKNNVSV	+
62	SLC47A1	VLGPAFLVQL	+
63	ERAP1	GLIEDHFDVTV	+
65	TPI1,TPI1P1	IYGGSVTGA	+

Seq ID NO	Nombre de gen	secuencia	Expresión de gen
76	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1	VLADDHLIEV	++
81	LRP2	SLLPALPKL	+
87	APOL1	LADGVQKV	++
93	PLIN2	GVMAGDIYSV	+
94	CYB5A	ILHHKVYDL	+
101	FLT1	HIYDKAFITV	++
105	HSPG2	ALADLDELLIRA	+
115	HAVCR1	LLDPKTIFL	+
120	SLC22A2	GLAGDNIYL	+
122	GAL3ST1	SLDPSSPQV	+++
123	MET	YVDPVITSI	++
125	NDRG1	KLDPTKTTL	+
127	FZD2,FZD1,FZD7	VLAPLFVYL	+
131	PLIN2	VMAGDIYSV	+
132	PLIN2	SVASTITGV	+
137	FKBP10	TLVAIVGV	+
139	ACLY	ILNVDGLIGV	+
143	TGFBI	ALFVRLLALA	+

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 ese modo, los inventores han podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 22 TUMAP restringidos al HLA-A*0201 de la invención, lo cual prueba que estos péptidos son epítopos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en el ser humano (Tabla 10).

Sensibilización *in vitro* de los 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 University clinics Mannheim, Alemania, tras el preceptivo consentimiento informado.

Los PBMC y linfocitos CD8+ aislados se incubaron 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 / estreptomycin 100 µg/ml (Cambrex, Colonia, Alemania), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemania), gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). En este paso también se añadieron al medio TCM 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 Ab 9.3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humano co-estimuladora purificada (Jung G y col. 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 152) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5) (SEQ ID N.º 153)), respectivamente.

Se tapizaron placas de 96 pocillos 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 μ l de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 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 y col., 2012 Parallel detection of antigen-specific T cell responses by combinatorial encoding of MHC multimers. Nat Protoc. 2012 Apr 12;7(5):891-902.), 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 para el IR cercano Live/dead® (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* para péptidos de RCC

Para los péptidos de HLA clase I probados, la inmunogenicidad *in vitro* se pudo demostrar por generación de líneas de células T específicas para péptido. Los ejemplos de los resultados de citometría de flujo después de tinción multimérica específica para TUMAP para 2 péptidos de la invención se muestran en la Figura 3 y 6 junto con los correspondientes controles negativos. Los resultados para 3 péptidos de la invención se resumen en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.10** A y B.

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

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

Seq ID	Péptido ID	pocillos	donantes
123	YVDPVITSI	+	+++ +
127	VLAPLFVYL	++	+++ +
143	ALFVRLLALA	+	+++

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

Ejemplos de resultados de experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por los solicitantes para los péptidos de la invención. Se indican los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro*. El porcentaje de pocillos positivos y donantes (entre los evaluables) se resumen según lo indicado <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID No	Secuencia	Pocillos positivos [%]
1	ALIVSLPYL	+
2	ILWREVVTI	+
3	RLLGEVQAL	+
6	VLFEISKTV	+
7	FLLSLIDRL	+
9	ILLQKPDSV	+
15	ILIKHLVKV	+
16	FMPEELPQL	+
18	YVLDLAAKV	++
20	AVANTTFTV	+

SEQ ID No	Secuencia	Pocillos positivos [%]
22	FLSPPLPSV	++
29	ILLDLEQAL	+
34	ELNNQNFYL	++
36	SLFGKKYIL	++
94	ILHHKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++++
98	KIPPVSPSI	++++

EJEMPLO 4

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos se sintetizaron usando síntesis peptídica en fase sólida estándar y bien establecida usando la estrategia Fmoc.

La identidad y la pureza de cada péptido individual se determinaron por espectrometría de masa y RP-HPLC analítica. Los péptidos se obtuvieron como liofilizados entre blancos y blancuzcos (sal de trifluoroacetato) en purezas >50%.

Todos los TUMAP se administran preferiblemente como sales de trifluoroacetato o sales de acetato, también son posibles otras formas de sal.

EJEMPLO 5

Ensayos de unión a MHC

Los péptidos candidatos para las terapias basadas en células T de acuerdo con la presente invención se ensayaron adicionalmente para ver su capacidad de unión a MHC (afinidad). Los complejos péptidos individuales -MHC se produjeron por intercambio de ligandos por UV, en donde se escinde un péptido sensible a UV con irradiación UV, y se intercambia con el péptido de interés a analizar. Solo los péptidos candidatos que se pueden unir eficazmente y estabilizar las moléculas de MHC receptoras de péptidos previenen la disociación de los complejos con 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 estabilizados con MHC. El ensayo se llevó a cabo como se

describe en forma general en Rodenko y col. (Rodenko y col., 2006).

Se recubrieron placas de 96 pocillos MAXISorp (NUNC) durante una noche con 2 µg/ml de estreptavidina en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4x y se bloquearon durante 1h a 37°C en solución amortiguadora de bloqueo con 2% de BSA. Los monómeros HLA-A*02:01/MLA-001 replegados sirvieron como estándares, cubriendo el rango entre 15 y 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC de la reacción de intercambio con UV se diluyeron 100 veces en solución amortiguadora de bloqueo. Se incubaron las muestras durante 1h a 37°C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con 2 µg/ml de anti-β2m conjugado con HRP durante 1 hora a 37°C, se lavaron nuevamente y se detectaron con solución de TMB que se detiene con NH₂SO₄. Se midió la absorción a 450 nm. Los péptidos candidatos que muestran un alto rendimiento de intercambio (preferiblemente mayor que 50%, más preferiblemente mayor que 75%) son en general los preferidos para la generación y producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o receptores de células T o fragmentos de los mismos, ya que los mismos muestran una avidéz suficiente para moléculas de MHC y previenen la disociación de los complejos con MHC.

Tabla 11: puntuaciones de unión a MHC de clase I.

La unión de péptidos restringidos a HLA-clase I, a HLA-A*02:01 se evaluó por el rendimiento de intercambio peptídico: ≥10% = +; ≥20% = ++; ≥50 = +++; ≥ 75% = ++++

Seq ID	Secuencia	Intercambio de péptidos
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	++
6	VLFEISKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	++
9	ILLQKPDSV	++
10	KLLQNNYGL	++

Seq ID	Secuencia	Intercambio de péptidos
11	FIQTEAPKEV	++
12	ALDPGQNQLI	++
13	KIMAQILTV	+++
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	++
16	FMPEELPQL	++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	++
20	AVANTTFTV	++
21	RLIQGDQILSV	++
22	FLSPPLPSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	+++
25	LLVPAHLVAA	++
27	SLSDLLVSL	+++
28	FIADLVVGL	++
29	ILLDLEQAL	+++
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+++
33	FIADVVEKI	++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	++
36	SLFGKKYIL	++
37	VLAPVILML	++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLQI	+++

Seq ID	Secuencia	Intercambio de péptidos
41	GLLCTLQKL	++
42	VILDTGTIQL	++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+++
45	ALLGIPLTL	+++
46	GLSEVLVQI	+++
47	TLAEVRVQEI	+++
48	VVASNIMEV	++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	++
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	++
53	FLLEIRQTL	++
54	ALVAKGLVQA	++
55	YLALILPVL	++
56	ILMDFSNSM	+++
57	SLQKEILYL	++
58	FLVDFEQSHL	++++
59	SLKNNVVS	+++
60	ILWKDIEYV	+++
61	SLMGILLRI	++
62	VLGPAFLVQL	+++
63	GLIEDHFDVTV	++
64	LLAASVALA	++
65	IYGGSVTGA	++
66	TLLKTIKV	++
67	LLDVLAPLV	++
68	YVLTQPPSV	++

Seq ID	Secuencia	Intercambio de péptidos
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	++
71	ALDGHLYAV	+++
72	YSLEKVFGI	++
73	GLDGIPFTV	+++
74	GLFHKQVTV	+++
75	FLIKSINLV	+++
76	VLADDHLIEV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	++
79	ALADIVWRA	+++
80	KLASMLETL	+++
81	SLLPALPKL	++
82	SLLQATDFMSL	+++
83	IQWSIVPEV	+++
84	YLMDEGAHL	++
85	FVMSEIRTV	+++
86	GLLQGKLALL	++
88	TLAELHISL	++
89	SLLLAVTEV	++
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	++
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++++
94	ILHHKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++
96	TLAETLVNL	+++
97	TLISELVQA	++

Seq ID	Secuencia	Intercambio de péptidos
98	KIPPVSPSI	++
99	GLAPHLEQI	++
100	KLNVAPLAV	++
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+++
103	KLQDGLLHI	++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	+++
106	VLMDLKALL	+++
107	VLMDLKALLL	+++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	++++
110	LLDLHSYLL	++
111	TLLETEMLL	++
112	LLFDHLEPIEL	+++
113	SLFDWNVKL	+++
114	ALAVNISAA	+++

EJEMPLO 6

Cuantificación absoluta de péptidos asociados a tumor presentados sobre la superficie celular

La generación de moléculas de unión, tales como anticuerpos y/o TCR, es un proceso laborioso, que se puede llevar a cabo solo para un número de blancos seleccionados. En el caso de péptidos específicos y asociados a tumor, los criterios de selección incluyen, pero sin restricciones, la exclusividad de la presentación y la densidad de péptidos presentados sobre la superficie celular. La cuantificación de las copias de TUMAP por célula en muestras de tumor sólido requiere la cuantificación absoluta de los TUMAP aislados, la eficiencia del aislamiento de los TUMAP, y el conteo celular de la muestra de tejido analizado.

Cuantificación peptídica por nanoLC-MS/MS

Para una cuantificación precisa de los péptidos por espectrometría de masa, se generó una curva de calibración para cada péptido usando el método de estándar interno. El estándar interno es una variante de cada péptido doblemente marcada con isótopo, es decir se incluyeron dos aminoácidos marcados con isótopo en la síntesis de los TUMAP. Se diferencia del péptido asociado a tumor solo por su masa, pero no muestra diferencias en otras propiedades fisicoquímicas (Anderson y col., 2012). Se agregó estándar interno a cada muestra de MS y se normalizaron todas las señales de MS a la señal de MS del estándar interno para eliminar potenciales varianzas de la técnica entre los experimentos de MS.

Las curvas de calibración se prepararon en por lo menos tres matrices diferentes, es decir se eluye el HLA a partir de muestras naturales similarmente a las muestras MS de rutina, y se midió cada preparación en corridas de MS por duplicado. Para la evaluación, se normalizaron las señales de MS a la señal del estándar interno y se calculó una curva de calibración por regresión logística.

Para la cuantificación de péptidos asociados a tumor a partir de las muestras de tejido, también se agregó a las respectivas muestras el estándar interno; se normalizaron las señales de MS al estándar interno y se cuantificaron usando la curva de calibración del péptido.

Eficiencia de aislamiento de péptido/MHC

Como para cualquier proceso de purificación de proteínas, el aislamiento de las proteínas de las muestras de tejido se asocia con una cierta pérdida de la proteína de interés. Para determinar la eficiencia del aislamiento de los TUMAP, se generaron complejos de péptido/MHC para todos los TUMAP seleccionados para su cuantificación absoluta. Para poder discriminar los complejos agregados de los péptidos/MHC naturales, se usaron versiones marcadas con isótopos individuales de los TUMAP, es decir se incluyó un aminoácido marcado con isótopo en la síntesis de los TUMAP. Estos complejos se agregaron en los lisados de tejido recién preparados, es decir en el punto más temprano posible del procedimiento de aislamiento de los TUMAP, y luego se capturaron como complejos de péptido/MHC naturales en la siguiente purificación por afinidad. La medida de la recuperación de los TUMAP marcados en forma individual lleva

por lo tanto a conclusiones con respecto a la eficacia del aislamiento de los TUMAP naturales individuales.

La eficiencia de aislamiento se analizó en un número chico de muestras y fue comparable entre estas muestras de tejido. Por el contrario, la eficiencia de aislamiento difiere entre los péptidos individuales. Esto sugiere que la eficiencia de aislamiento, a pesar de que se determinó en un número limitado de muestras de tejido, se puede extrapolar a cualquier otra preparación de tejido. Sin embargo, es necesario analizar cada TUMAP en forma individual ya que la eficiencia de aislamiento no se puede extrapolar de un péptido a otros.

Determinación de conteo celular en tejido sólido congelado

Con el objetivo de determinar el conteo celular de las muestras de tejido sometidas a cuantificación peptídica absoluta, los inventores aplicaron análisis por conteo de ADN. Este método es aplicable a un amplio rango de muestras de diferente origen y, más importantemente, a muestras congeladas (Alcoser y col., 2011; Forsey y Chaudhuri, 2009; Silva y col., 2013). Durante el protocolo de aislamiento de los péptidos, se procesa una muestra de tejido a un lisado homogéneo, del que se toma una alícuota pequeña de lisado. La alícuota se divide en tres partes, de las que se aísla ADN (QiaAmp ADN Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemania). El contenido de ADN total de cada aislamiento de ADN se cuantifica usando un ensayo de cuantificación de ADN basado en fluorescencia (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Alemania) en por lo menos dos réplicas.

Con el objetivo de calcular el número de células, se generó una curva estándar de ADN a partir de alícuotas de células sanguíneas sanas individuales, con un rango de números celulares definidos. La curva estándar se usa para calcular el conteo celular total a partir del contenido de ADN total de cada aislamiento de ADN. El conteo celular medio total de la muestra de tejido usada para el aislamiento del péptido se extrapola considerando el volumen conocido de las alícuotas de lisado y el volumen total del lisado.

Copias de péptido por célula

Con los datos de los experimentos que se mencionaron previamente, los inventores calcularon el número de copias de TUMAP por célula dividiendo la cantidad

total de péptido por el conteo celular total de la muestra, seguido por la división por la eficiencia de aislamiento. El número de copias por células para los péptidos seleccionados se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Número de copias absoluto. La tabla lista los resultados de la cuantificación peptídica absoluta en muestras de tumor de NSCLC. La mediana del número de copias por célula se indica para cada péptido: <100 = +; >=100 = ++; >=1,000 +++; >=10,000 = +++. Se indica el número de muestras en donde hay disponibilidad de datos de MS evaluables de alta calidad.

SEQ ID No.	Código de péptido	Copias por célula (mediana)	Número de muestras
1	SLC17A3-001	++	18

LISTA DE REFERENCIAS

- PLoS.One. **10** (2015): e0119247
- Agalliu, I. y col., JAMA Neurol. **72** (2015): 58-65
- Agesen, T. H. y col., Gut **61** (2012): 1560-1567
- Alagaratnam, S. y col., Int.J Androl **34** (2011): e133-e150
- Alcoser, S. Y. y col., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124
- Alholle, A. y col., Epigenetics. **8** (2013): 1198-1204
- Allison, J. P. y col., Science **270** (1995): 932-933
- Altman, M. K. y col., Biochem.Res.Int. **2012** (2012): 518437
- Amatschek, S. y col., Cancer Res **64** (2004): 844-856
- Anastas, J. N. y col., J Clin Invest **124** (2014): 2877-2890
- Andersen, R. K. y col., Pigment Cell Melanoma Res. **28** (2015): 267-280
- Andersen, R. S. y col., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902
- Anderson, L. N. y col., PLoS.One. **8** (2013): e66768
- Anderson, N. L. y col., J Proteome.Res **11** (2012): 1868-1878
- Antony-Debre, I. y col., Cancer Cell **27** (2015): 609-611
- Appay, V. y col., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814

- Araujo, W. F. y col., Urol.Oncol (2015)
- Arribas, A. J. y col., Blood **125** (2015): 1922-1931
- Asad, M. y col., Cell Death.Dis. **5** (2014): e1346
- Asaga, S. y col., Anticancer Res. **26** (2006): 35-42
- Avery-Kiejda, K. A. y col., BMC.Cancer **14** (2014): 253
- Avigan, D. y col., Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708
- Awasthi, N. y col., Cancer Lett. **358** (2015): 59-66
- Ayshamgul, H. y col., Chin Med.J (Engl.) **124** (2011): 341-346
- Bae, D. H. y col., J Clin Pathol. **66** (2013): 911-917
- Baek, G. y col., Cell Rep. **9** (2014): 2233-2249
- Baenke, F. y col., J Pathol. (2015)
- Bai, L. y col., J Cell Biochem. **113** (2012): 322-328
- Banchereau, J. y col., Cell **106** (2001): 271-274
- Bao, B. Y. y col., Clin Cancer Res. **17** (2011): 928-936
- Bao, W. y col., Biomed.Pharmacother. **70** (2015): 97-102
- Basson, M. D. y col., Mol.Oncol **9** (2015): 513-526
- Bauer, K. M. y col., J Proteome.Res. **13** (2014): 4910-4918
- Beatty, G. y col., J Immunol **166** (2001): 2276-2282
- Bedir, R. y col., Iran J Otorhinolaryngol. **27** (2015): 69-74
- Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109
- Beleford, D. y col., Clin Cancer Res. **16** (2010): 398-409
- Bell, J. L. y col., Cell Mol Life Sci. **70** (2013): 2657-2675
- Benjamini, Y. y col., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300
- Bhatnagar, R. y col., Oral Oncol **48** (2012): 831-835
- Bill, K. L. y col., Lab Invest (2015)
- Blanke, K. L. y col., Cancer Causes Control **25** (2014): 1513-1521
- Bleumer, I. y col., Eur.Urol. **44** (2003): 65-75
- Bonventre, J. V., Trans.Am.Clin Climatol.Assoc. **125** (2014): 293-299
- Boulter, J. M. y col., Protein Eng **16** (2003): 707-711

- Braumuller, H. y col., *Nature* (2013)
- Brendle, A. y col., *Carcinogenesis* **29** (2008): 1394-1399
- Brossart, P. y col., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. y col., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Bunatova, K. y col., *Anticancer Res.* **32** (2012): 4601-4606
- Card, K. F. y col., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Carvalho, F. L. y col., *Prostate* **74** (2014): 933-945
- Chanock, S. J. y col., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- Chatterjee, M. y col., *Haematologica* **98** (2013): 1132-1141
- Chen, K. y col., *J Cancer Res.Clin Oncol* **140** (2014a): 1715-1721
- Chen, Q. y col., *PLoS.One.* **9** (2014b): e88386
- Chen, S. T. y col., *Cancer Sci.* **102** (2011): 2191-2198
- Chen, Y. C. y col., *Int.J Cancer* **135** (2014c): 117-127
- Chen, Y. L. y col., *Int J Surg.* **11** (2013): 85-91
- Cheng, A. S. y col., *Gastroenterology* **144** (2013): 122-133
- Cheng, J. y col., *Cancer Lett.* **310** (2011): 35-45
- Cheon, D. J. y col., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 711-723
- Cho, E. y col., *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* **25** (2011): 651-665
- Chong, Y. y col., *Oncol Rep.* **31** (2014): 2535-2544
- Chu, X. y col., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 5819-5823
- Cohen, C. J. y col., *J Mol Recognit.* **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. y col., *J Immunol* **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. y col., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. y col., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- Colombetti, S. y col., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738
- Cuadros, T. y col., *Cancer Res* **74** (2014): 1416-1428
- Cuadros, T. y col., *Eur.J Cancer* **49** (2013): 2034-2047
- D'Angelo, V. y col., *J Neurooncol.* **117** (2014): 287-294
- Dadkhah, E. y col., *Arch.Iran Med.* **16** (2013): 463-470
- Dannenmann, S. R. y col., *Cancer Immunol.Res.* **1** (2013): 288-295

- Davidov, T. y col., J Surg.Res. **190** (2014): 565-574
- Deng, B. y col., Tumour.Biol. (2015)
- Dengjel, J. y col., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. y col., J Immunol **171** (2003): 2197-2207
- Devaney, J. M. y col., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **16** (2013): 292-300
- Dey, N. y col., PLoS.One. **8** (2013): e77425
- Dienstmann, R. y col., Am.Soc.Clin Oncol Educ.Book. **35** (2015): e149-e156
- Ding, L. C. y col., Oncol Rep. (2015)
- Dong, R. y col., PLoS.One. **9** (2014): e85599
- El Behery, M. M. y col., Arch.Gynecol.Obstet. **288** (2013): 1371-1376
- Elewa, M. A. y col., Clin Exp.Metastasis (2015)
- Elouazzani, H. y col., J Clin Imaging Sci. **4** (2014): 33
- Falk, K. y col., Nature **351** (1991): 290-296
- Fan, H. Z. y col., J Cancer Res.Clin Oncol **135** (2009): 591-602
- Fang, Z. Q. y col., Genet.Mol Res **12** (2013): 1479-1489
- Fei, J. y col., Tumour.Biol. **34** (2013): 2329-2335
- Felizola, S. J. y col., J Steroid Biochem.Mol.Biol. **144 Pt B** (2014): 410-416
- Feng, H. y col., J Clin Invest **124** (2014): 3741-3756
- Ferguson, B. W. y col., BMC.Cancer **13** (2013): 593
- Fernandez-Banet, J. y col., Genomics **103** (2014): 189-203
- Ferrer-Ferrer, M. y col., Arch.Med.Res **44** (2013): 467-474
- Findeis-Hosey, J. J. y col., Biotech.Histochem. **87** (2012): 24-29
- Finocchiaro, G. y col., Ann.Transl.Med. **3** (2015): 83
- Fleischer, M. y col., Genes Chromosomes.Cancer **50** (2011): 1010-1020
- Fong, L. y col., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- Fontes-Oliveira, C. C. y col., Biochim.Biophys.Acta **1830** (2013): 2770-2778
- Forconi, F. y col., Haematologica **93** (2008): 697-705
- Forloni, M. y col., Cancer Res. **70** (2010): 916-924
- Forsey, R. W. y col., Biotechnol.Lett. **31** (2009): 819-823
- Franco, R. y col., Histol.Histopathol. **30** (2015): 707-714

- Fu, Q. F. y col., *J Hematol.Oncol* **8** (2015): 22
- Fu, Y. y col., *Mol.Biol.Rep.* **38** (2011): 693-702
- Fujinaga, T. y col., *Int.J Oncol* **44** (2014): 1614-1624
- Gabrilovich, D. I. y col., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
- Gackiere, F. y col., *Biol.Open.* **2** (2013): 941-951
- Gadd, S. y col., *Lab Invest* **90** (2010): 724-738
- Gantsev, S. K. y col., *Biomed.Pharmacother.* **67** (2013): 363-366
- Gao, H. y col., *Cancer Lett.* **344** (2014): 54-61
- Gao, H. J. y col., *J Cancer Res.Clin Oncol* **141** (2015a): 1151-1162
- Gao, W. y col., *BMC.Cancer* **15** (2015b): 367
- Garg, M. y col., *Cancer* **116** (2010a): 3785-3796
- Garg, M. y col., *Eur.J Cancer* **46** (2010b): 207-215
- Garner, J. M. y col., *PLoS.One.* **10** (2015): e0125838
- Gattinoni, L. y col., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
- Gbormittah, F. O. y col., *J Proteome.Res.* **13** (2014): 4889-4900
- Gilkes, D. M. y col., *Mol Cancer Res* **11** (2013): 456-466
- Giovannetti, E. y col., *J Natl.Cancer Inst.* **106** (2014): djt346
- Gnjatic, S. y col., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. y col., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
- Goksel, G. y col., *J BUON.* **19** (2014): 207-214
- Gomez-Villafuertes, R. y col., *J Neurochem.* **131** (2014): 290-302
- Gong, Y. y col., *Adv.Anat.Pathol.* **21** (2014): 191-200
- Gonzalez, J. E. y col., *J Am.Acad.Audiol.* **25** (2014): 253-260
- Goode, G. y col., *PLoS.One.* **9** (2014): e100103
- Granja, S. y col., *Oncotarget.* **6** (2015): 6708-6721
- Green, M. R. y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Griffith, O. L. y col., *J Clin.Oncol.* **24** (2006): 5043-5051
- Grunewald, T. G. y col., *Biol.Cell* **105** (2013): 535-547
- Guerrero-Preston, R. y col., *Epigenetics.* **9** (2014): 1031-1046

- Guo, P. y col., *Onco.Targets.Ther.* **8** (2015): 73-79
- Halldorsdottir, A. M. y col., *Am.J Hematol.* **87** (2012): 361-367
- Han, B. y col., *Mol.Cancer* **14** (2015): 64
- Havens, M. A. y col., *PLoS.Genet.* **10** (2014): e1004312
- Heist, R. S. y col., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **112** (2015): 1547-1552
- Hevir-Kene, N. y col., *Chem Biol.Interact.* **234** (2015): 309-319
- Hirota, E. y col., *Int.J Oncol.* **29** (2006): 799-827
- Hlavac, V. y col., *Medicine (Baltimore)* **93** (2014): e255
- Hoffmann, N. E. y col., *Cancer* **112** (2008): 1471-1479
- Hofmann, H. S. y col., *Eur.Urol.* **48** (2005): 77-81
- Hogan, L. E. y col., *Blood* **118** (2011): 5218-5226
- Holtl, L. y col., *Clin.Cancer Res.* **8** (2002): 3369-3376
- Honke, K. y col., *J Biochem.* **119** (1996): 421-427
- Hovnanian, A., *Subcell.Biochem.* **45** (2007): 337-363
- Hu, C. A. y col., *FEBS Lett.* **586** (2012): 947-955
- Hu, M. y col., *J Surg.Oncol* **108** (2013): 192-196
- Hu, S. y col., *J Cancer Res Clin Oncol* **140** (2014): 883-893
- Hu, Y. y col., *Mol.Cancer Ther.* **14** (2015): 289-297
- Hua, D. y col., *Int.J Mol Med.* **30** (2012): 1267-1274
- Huang, C. N. y col., *Ann.Oncol* **23** (2012a): 707-713
- Huang, G. y col., *J Surg.Oncol* **105** (2012b): 420-424
- Huang, Y. y col., *Cell Biosci.* **3** (2013): 16
- Hung, T. H. y col., *Int.J Biochem.Cell Biol.* **53** (2014): 55-65
- Hunt, J. D. y col., *Int.J Cancer* **114** (2005): 101-108
- Hwang, M. L. y col., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Ilm, K. y col., *Mol.Cancer* **14** (2015): 38
- Inoue, Y. y col., *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2015)
- Inzelberg, R. y col., *Neurology* **78** (2012): 781-786
- Ishiguro, Y. y col., *Gan* **75** (1984): 53-60
- Jeng, Y. M. y col., *Br.J Surg.* **96** (2009): 66-73

- Jensen, D. H. y col., J Oral Pathol.Med. (2014)
- Jiang, J. G. y col., Cancer Res **65** (2005): 4707-4715
- Jiao, J. y col., Cancer Lett. **320** (2012): 96-103
- Jin, Z. y col., Anticancer Res. **33** (2013): 5199-5203
- Joerger, M. y col., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **18** (2015): 167-172
- Johnson, R. H. y col., Oncotarget. (2015)
- Jose-Eneriz, E. S. y col., Br.J Haematol. **142** (2008): 571-582
- Jung, G. y col., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Junnla, S. y col., BMC.Cancer **10** (2010): 73
- Kamphausen, E. y col., Cancer Immunol.Immunother. **59** (2010): 1273-1284
- Kang, M. R. y col., J Pathol. **217** (2009): 702-706
- Karagiannis, G. S. y col., Mol.Oncol **8** (2014): 1240-1252
- Kato, M. y col., Oncol Rep. **13** (2005): 367-370
- Kawahara, R. y col., PLoS.One. **9** (2014): e115004
- Kawakami, K. y col., Int.J Oncol (2015)
- Khan, R. y col., Clin.Proteomics. **10** (2013a): 6
- Khan, Z. y col., Cancer Invest **31** (2013b): 404-411
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Kim, J. H. y col., J Korean Med.Sci. **8** (1993): 68-72
- Kim, J. S. y col., Cancer Biol.Ther. **13** (2012): 638-646
- Kim, M. y col., Mol Cancer Res **6** (2008): 222-230
- Kirov, A. y col., J Cell Biochem. (2015)
- Kleiber, K. y col., Anticancer Res. **27** (2007): 55-61
- Kobayashi, H. y col., Oncol Lett. **10** (2015): 612-618
- Koh, J. y col., Mol.Endocrinol. **25** (2011): 867-876
- Komatsu, S. y col., Br.J Cancer **112** (2015): 357-364
- Konno, R., Hum.Cell **14** (2001): 261-266
- Koo, J. S. y col., Am.J Clin Pathol. **143** (2015): 584-592
- Korosec, B. y col., Cancer Genet.Cytogenet. **171** (2006): 105-111
- Koshikawa, K. y col., Oncogene **21** (2002): 2822-2828

- Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* **5** (2006): 471-484
- Kuang, S. Q. y col., *Leukemia* **22** (2008): 1529-1538
- Kubota, H. y col., *Cell Stress.Chaperones.* **15** (2010): 1003-1011
- Kumps, C. y col., *PLoS.One.* **8** (2013): e52321
- Kwon, J. y col., *Int J Oncol* **43** (2013): 1523-1530
- Lai, K. K. y col., *PLoS.Genet.* **7** (2011): e1002147
- Lai, Y. J. y col., *Mol.Cell Biol.* **30** (2010): 5582-5596
- Lapointe, J. y col., *Endocrinology* **140** (1999): 4486-4493
- Lebdai, S. y col., *Urol.Oncol* **33** (2015): 69-8
- Lee, H. J. y col., *Oncol Lett.* **8** (2014): 1986-1992
- Lee, H. K. y col., *Oncotarget.* **6** (2015): 1850-1864
- Lee, J. y col., *Yonsei Med.J* **54** (2013): 1158-1167
- Li, J. y col., *J Mol.Histol.* **45** (2014a): 47-57
- Li, M. y col., *Int.J Oncol.* **24** (2004): 305-312
- Li, R. y col., *Curr.Cancer Drug Targets.* **14** (2014b): 274-285
- Li, W. y col., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **6** (2013): 2430-2440
- Li, X. X. y col., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014c): 2729-2736
- Li, Y. y col., *BMC.Cancer* **15** (2015): 417
- Liddy, N. y col., *Nat Med.* **18** (2012): 980-987
- Lin, L. y col., *Oncol Lett.* **6** (2013): 740-744
- Lin, M. C. y col., *Oral Oncol* **50** (2014): 478-484
- Lin, Y. W. y col., *Eur.J Cancer* **45** (2009): 2041-2049
- Lin, Z. Y. y col., *Biomed.Pharmacother.* **66** (2012): 454-458
- Liu, B. y col., *Zhonghua Fu Chan Ke.Za Zhi.* **45** (2010a): 41-44
- Liu, F. y col., *World J Surg.Oncol* **12** (2014a): 333
- Liu, H. y col., *Carcinogenesis* **34** (2013): 885-892
- Liu, J. y col., *Oncotarget.* (2015)
- Liu, K. y col., *Tumour.Biol.* **35** (2014b): 995-1002
- Liu, S. y col., *Tumour.Biol.* **35** (2014c): 9897-9904
- Liu, Y. y col., *J Neurooncol.* **99** (2010b): 13-24

- Liu, Y. y col., Mol.Cancer **9** (2010c): 186
- Ljungberg, B. y col., Eur.Urol. **60** (2011): 615-621
- Ljunggren, H. G. y col., J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. y col., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Lourenco, G. J. y col., Breast Cancer Res Treat. **100** (2006): 335-338
- Lu, Y. Y. y col., Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi. **22** (2014): 1336-1340
- Lukas, T. J. y col., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
- Lung, H. L. y col., Int.J Cancer **127** (2010): 304-312
- Lustosa, S. A. y col., ScientificWorldJournal. **2014** (2014): 102541
- Lv, Z. y col., Tumour.Biol. **35** (2014): 10497-10502
- Ma, G. F. y col., Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci. **19** (2015): 578-585
- Ma, J. y col., Pathol.Oncol Res **19** (2013): 821-832
- Mak, A. B. y col., J Mol.Biol. **426** (2014): 2175-2182
- Malik, M. A. y col., Mol.Biol.Rep. **39** (2012): 9095-9104
- Marten, A. y col., Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002): 637-644
- Martinez-Lopez, N. y col., Gastroenterology **143** (2012): 787-798
- Massari, F. y col., Cancer Treat.Rev. **41** (2015): 114-121
- Masugi, Y. y col., Lab Invest **95** (2015): 308-319
- Matsubara, J. y col., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **20** (2011): 2195-2203
- Mehta, A. M. y col., Immunogenetics **67** (2015): 267-275
- Mei, J. y col., Oncogene **25** (2006): 849-856
- Mertens-Walker, I. y col., BMC.Cancer **15** (2015): 164
- Meziere, C. y col., J Immunol **159** (1997): 3230-3237
- Michael, A. y col., Lancet Oncol. **4** (2003): 215-223
- Minami, T. y col., Int.Immunopharmacol. **20** (2014): 59-65
- Minchenko, O. H. y col., World J Gastroenterol. **20** (2014): 13705-13717
- Miyoshi, N. y col., Oncol Rep. **23** (2010): 505-510
- Mo, Y. y col., Cancer Lett. **323** (2012): 147-154
- Moch, H., Semin.Cancer Biol. **23** (2013): 3-9

- Mochizuki, S. y col., *Cancer Sci.* **98** (2007): 621-628
- Mohelnikova-Duchonova, B. y col., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **72** (2013a): 669-682
- Mohelnikova-Duchonova, B. y col., *Pancreas* **42** (2013b): 707-716
- Molina-Pinelo, S. y col., *PLoS.One.* **9** (2014): e90524
- Morgan, R. A. y col., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mori, M. y col., *Transplantation* **64** (1997): 1017-1027
- Moriya, Y. y col., *Oral Oncol* **51** (2015): 84-89
- Morrissey, J. J. y col., *Urology* **83** (2014): 256-14
- Mortara, L. y col., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- Motzer, R. J. y col., *Clin.Cancer Res.* **10** (2004): 6302S-6303S
- Moutinho, C. y col., *J Natl.Cancer Inst.* **106** (2014): djt322
- Mueller, L. N. y col., *J Proteome.Res* **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. y col., *Proteomics.* **7** (2007): 3470-3480
- Mukai, M. y col., *Am.J Surg.Pathol.* **10** (1986): 212-218
- Mumberg, D. y col., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
- Mustafa, D. A. y col., *Gene Regul.Syst.Bio* **4** (2010): 103-107
- Nagy, Z. y col., *Mol.Cancer* **13** (2014): 96
- Nakai, Y. y col., *J Cancer Res.Clin Oncol* **141** (2015): 933-939
- Narjoz, C. y col., *PLoS.One.* **9** (2014): e95532
- Narkiewicz, J. y col., *Oncol Rep.* **21** (2009): 1529-1537
- Naryzhnyi, S. N. y col., *Biomed.Khim.* **60** (2014): 308-321
- Ng, K. T. y col., *Mol.Cancer* **13** (2014): 196
- Nguyen, H. y col., *J Biol.Chem* **290** (2015): 13641-13653
- Ni, I. B. y col., *Hematol.Rep.* **4** (2012): e19
- Nikitovic, D. y col., *Biochim.Biophys.Acta* **1840** (2014): 2471-2481
- Nimptsch, K. y col., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **18** (2009): 49-56
- Nishio, S. y col., *Cancer Lett.* **264** (2008): 36-43
- Notaridou, M. y col., *Int.J Cancer* **128** (2011): 2063-2074
- Nowak, D. y col., *Blood* **115** (2010): 1049-1053
- Oka, K. y col., *Lab Invest* **60** (1989): 38-44

- Okudela, K. y col., PLoS.One. **9** (2014): e87193
- Olesen, S. H. y col., Mol Cell Proteomics. **4** (2005): 534-544
- Ozawa, D. y col., Ann.Surg.Oncol (2014)
- Paradis, V. y col., Gut **62** (2013): 911-919
- Pathan, N. y col., J Biol.Chem **276** (2001): 32220-32229
- Pavlikova, N. y col., Exp.Cell Res. **333** (2015): 1-10
- Pedersen, M. O. y col., Leuk.Lymphoma **51** (2010): 314-328
- Penning, T. M., Chem Res.Toxicol. **27** (2014): 1901-1917
- Pereira, P. M. y col., Org.Biomol.Chem. **12** (2014): 1804-1811
- Peters, D. G. y col., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **14** (2005): 1717-1723
- Petrini, I., Ann.Transl.Med. **3** (2015): 82
- Pinheiro, J. y col., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Planutis, K. y col., J Transl.Med. **11** (2013): 50
- Plebanski, M. y col., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. y col., Virology **202** (1994): 949-955
- Prakash, S. y col., J Pediatr.Hematol.Oncol **27** (2005): 179-187
- Principe, M. y col., Oncotarget. **6** (2015): 11098-11113
- Qian, Z. y col., Chem Biol.Interact. **184** (2010): 50-57
- Quinn, M. C. y col., Int J Oncol **42** (2013): 912-920
- Ragnum, H. B. y col., Int.J Radiat.Oncol Biol.Phys. **87** (2013): 753-760
- Ramazzotti, G. y col., Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr. **21** (2011): 291-301
- Rammensee, H. G. y col., Immunogenetics **50** (1999): 213-219
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Rehfeld, A. y col., Front Endocrinol.(Lausanne) **5** (2014): 46
- Ren, Y. y col., Mol.Cell Proteomics. **13** (2014): 3126-3137
- Renehan, A. G. y col., Int.J Cancer **126** (2010): 692-702
- Renehan, A. G. y col., Lancet **371** (2008): 569-578
- Renkvist, N. y col., Cancer Immunol.Immunother. **50** (2001): 3-15

- Richardson, A. y col., Crit Rev.Oncog. **18** (2013): 409-434
- Rini, B. I. y col., Curr.Opin.Oncol. **20** (2008): 300-306
- Rini, B. I. y col., Cancer **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. y col., Science **249** (1990): 918-921
- Rocken, C. y col., Pathologie **33 Suppl 2** (2012): 235-240
- Rodenko, B. y col., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132
- Royds, J. A. y col., J Clin Pathol. **38** (1985): 1258-1260
- Ruiz-Martinez, J. y col., Mov Disord. **29** (2014): 750-755
- Sachdeva K y col., <http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview> (2010)
- Sahasrabuddhe, N. A. y col., Biochem.Biophys.Res.Comm. **446** (2014): 863-869
- Saiki, R. K. y col., Science **239** (1988): 487-491
- Sakamoto, L. H. y col., Leuk.Res. **38** (2014): 496-502
- Sasnauskiene, A. y col., Medicina (Kaunas.) **50** (2014): 14-18
- Sato, T. y col., PLoS.One. **8** (2013): e59444
- Schlomann, U. y col., Nat Commun. **6** (2015): 6175
- Schuetz, A. N. y col., J Mol.Diagn. **7** (2005): 206-218
- Schumann, T. y col., Oncotarget. (2015)
- Scrideli, C. A. y col., Leuk.Res. **34** (2010): 32-37
- Sedlakova, I. y col., Int.J Gynecol.Cancer **25** (2015): 236-243
- Seeger, F. H. y col., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- Seong, J. y col., Mol.Biol.Rep. **39** (2012): 3597-3601
- Sethakorn, N. y col., J Recept.Signal.Transduct.Res. **33** (2013): 166-171
- Sherman, F. y col., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Shu, J. y col., Cancer Res. **66** (2006): 5077-5084
- Shukla, S. y col., Cancer Res. **73** (2013): 6563-6573
- Sieuwerts, A. M. y col., Clin.Chem **53** (2007): 1280-1288
- Sigari, N. y col., Clin Lab **60** (2014): 23-27
- Silva, L. P. y col., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Singh, S. y col., Tumour.Biol. (2014)
- Singh-Jasuja, H. y col., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195

- Slater, E. P. y col., *Transl.Oncol.* **6** (2013): 99-103
- Small, E. J. y col., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094
- Song, J. y col., *PLoS.One.* **9** (2014): e110074
- Sowalsky, A. G. y col., *Mol.Cancer Res.* **13** (2015): 98-106
- Sprowl, J. A. y col., *Clin Pharmacol.Ther.* **94** (2013): 585-592
- Staal-Viliare, A. y col., *Leuk.Lymphoma* **48** (2007): 439-441
- Staehli, F. y col., *J Immunol.* **188** (2012): 3820-3828
- Stamatopoulos, K. y col., *Blood* **106** (2005): 3575-3583
- Stein, U., *Expert.Opin.Ther.Targets.* **17** (2013): 1039-1052
- Steinway, S. N. y col., *PLoS.One.* **10** (2015): e0128159
- Stoehr, C. G. y col., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **6** (2013): 998-1008
- Strekalova, E. y col., *Clin.Cancer Res.* (2015)
- Sturm, M. y col., *BMC.Bioinformatics.* **9** (2008): 163
- Su, H. y col., *J Transl.Med.* **13** (2015): 104
- Su, Z. y col., *Cancer Res.* **63** (2003): 2127-2133
- Suh, K. S. y col., *Clin.Cancer Res.* **13** (2007a): 121-131
- Suh, K. S. y col., *Mol.Carcinog.* **46** (2007b): 599-604
- Suhovskih, A. V. y col., *Cell Tissue Res.* (2015)
- Sun, W. y col., *Cancer Res.* **74** (2014a): 1091-1104
- Sun, Z. y col., *J Proteome.Res* **13** (2014b): 1593-1601
- Szarvas, T. y col., *Int J Cancer* **135** (2014): 1596-1604
- Taguchi, O. y col., *Clin Chim.Acta* **244** (1996): 69-81
- Tam, C. W. y col., *Endocrinology* **147** (2006): 5023-5033
- Tan, M. H. y col., *Breast Cancer Res.Treat.* **131** (2012): 849-858
- Tanaka, J. y col., *J Oral Pathol.Med.* **44** (2015): 126-133
- Tanaka, T. y col., *J Cancer Res.Clin Oncol* **140** (2014): 503-513
- Tanic, N. y col., *Anticancer Res.* **26** (2006): 2137-2142
- Tashiro, A. y col., *Am.J Cancer Res.* **4** (2014): 528-536
- Teufel, R. y col., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- Thiel, A. y col., *Oncol Rep.* **26** (2011): 615-620

- Tong, S. Y. y col., *Cancer Invest* **30** (2012): 642-645
- Tong, W. G. y col., *Epigenetics*. **5** (2010): 499-508
- Toth, K. y col., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* **22** (2014): 642-647
- Tran, E. y col., *Science* **344** (2014a): 641-645
- Tran, T. T. y col., *Photochem.Photobiol.* **90** (2014b): 1136-1143
- Tsourlakakis, M. C. y col., *Int.J Mol.Sci.* **16** (2015): 8591-8606
- Vachani, A. y col., *Clin Cancer Res.* **13** (2007): 2905-2915
- Vasiljevic, A. y col., *Neuropathology.* **33** (2013): 149-161
- Volz, N. B. y col., *Pharmacogenomics.J* **15** (2015): 69-76
- Wake, N. C. y col., *Hum.Mutat.* **34** (2013): 1650-1661
- Walter, S. y col., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. y col., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wang, B. S. y col., *Cell Stress.Chaperones.* **18** (2013a): 359-366
- Wang, D. y col., *Mol.Cell Biochem.* **396** (2014a): 67-77
- Wang, G. y col., *Tumour.Biol* **36** (2015a): 1055-1065
- Wang, H. y col., *J Biol.Chem* **289** (2014b): 4009-4017
- Wang, J. H. y col., *World J Gastroenterol.* **16** (2010a): 5642-5646
- Wang, L. H. y col., *Tumour.Biol.* **35** (2014c): 1157-1168
- Wang, R. y col., *Biomed.Res.Int.* **2013** (2013b): 195692
- Wang, T. P. y col., *Exp.Cell Res.* **316** (2010b): 2893-2902
- Wang, W. M. y col., *Mol.Med.Rep.* (2015b)
- Wang, Y. y col., *J Biol.Chem* **289** (2014d): 14225-14238
- Wang, Y. y col., *Clin.Chem Lab Med.* **48** (2010c): 1475-1479
- Wang, Y. y col., *Anticancer Res* **33** (2013c): 207-214
- Wang, Y. y col., *Pathol.Oncol Res.* **20** (2014): 611-618
- Wang, Z. y col., *J Cancer Res Clin Oncol* **141** (2015c): 1353-1361
- Warren, C. R. y col., *J Cell Biochem.* **115** (2014): 1322-1333
- Waugh, M. G., *Mol.Neurobiol.* (2014)
- Wei, Q. y col., *Cancer Res.* **69** (2009): 2332-2339
- Westphal, P. y col., *Am.J Clin Pathol.* **143** (2015): 248-256

- Wierecky, J. y col., *Cancer Res.* **66** (2006): 5910-5918
- Wikman, H. y col., *PLoS.One.* **7** (2012): e47537
- Willcox, B. E. y col., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Wittig, B. y col., *Hum.Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- Wlodarski, M. W. y col., *J Leukoc.Biol* **83** (2008): 589-601
- World Cancer Report, (2014)
- World Health Organization Classification of Tumours, (2004)
- Wu, M. y col., *Oncogene* **23** (2004): 6815-6819
- Wu, Y. M. y col., *Cancer Res* **71** (2011): 7270-7279
- Xiao, L. y col., *Biochim.Biophys.Acta* (2015)
- Xiao, W. y col., *Mol.Med.Rep.* **10** (2014): 453-458
- Xin, Z. y col., *Virchows Arch.* **465** (2014): 35-47
- Xu, Y. y col., *J Cell Biochem.* **115** (2014): 1112-1121
- Xu, Z. y col., *Oncol Rep.* **33** (2015): 2899-2907
- Yamamoto, M. y col., *Cancer Res.* **65** (2005): 8706-8714
- Yan, P. y col., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 8923-8929
- Yang, C. Y. y col., *J Immunol* **192** (2014a): 1547-1557
- Yang, D. y col., *Oncogene* **30** (2011): 4590-4600
- Yang, J. y col., *J Proteomics.* **109** (2014b): 162-175
- Yang, W. y col., *Med.Oncol* **31** (2014c): 826
- Yang, W. y col., *Tumour.Biol.* **35** (2014d): 8267-8279
- Yano, Y. y col., *Cancer Lett.* **207** (2004): 139-147
- Yao, Y. y col., *Cell Physiol Biochem.* **35** (2015): 983-996
- Yeh, I. y col., *Nat.Comm.* **6** (2015): 7174
- Yeom, S. Y. y col., *Mol.Cancer Ther.* **13** (2014): 3049-3061
- Yin, Y. y col., *Tumour.Biol.* **34** (2013): 3611-3617
- Yoshida, A. y col., *Hum.Cell* **26** (2013): 56-66
- Yoshida, Y. y col., *Anticancer Res.* **32** (2012): 2301-2308
- Yu, P. H. y col., *PLoS.One.* **8** (2013): e82254
- Yu, Z. y col., *Cancer Lett.* **353** (2014): 182-193
- Yuan, R. H. y col., *Ann Surg.Oncol* **16** (2009): 1711-1719

- Zaghloul, R. A. y col., Eur.J Pharmacol. **746** (2015): 353-362
- Zamani-Ahmadmahmudi, M. y col., Electrophoresis **35** (2014): 901-910
- Zaremba, S. y col., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zhang, B. y col., Blood **106** (2005): 1355-1361
- Zhang, H. y col., Cancer Lett. **323** (2012a): 106-113
- Zhang, J. y col., Mol.Med.Rep. **10** (2014a): 749-754
- Zhang, J. y col., Xi.Bao.Yu Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za Zhi. **29** (2013): 190-193
- Zhang, L. y col., Dig.Dis.Sci. **57** (2012b): 2608-2614
- Zhang, S. D. y col., Onco.Targets.Ther. **8** (2015): 835-843
- Zhang, X. D. y col., Int.J Clin Exp.Med. **7** (2014b): 1190-1196
- Zhao, M. y col., Cancer Invest **32** (2014): 464-469
- Zhao, M. y col., Oncotarget. (2015a)
- Zhao, Z. y col., Med.Oncol **32** (2015b): 112
- Zhen, T. y col., Oncotarget. **5** (2014): 3756-3769
- Zhou, J. y col., Oncol Rep. **30** (2013): 2229-2237
- Zhu, J. y col., Int.J Clin Exp.Pathol. **8** (2015): 702-710
- Zienert, E. y col., Cancer Lett. **364** (2015): 17-24
- Zietek, Z. y col., Pol.Tyg.Lek. **51** (1996): 86-88
- Zizi-Sermpetzoglou, A. y col., Eur.J Gynaecol.Oncol **35** (2014): 325-327
- Zu, X. Y. y col., Recent Pat Anticancer Drug Discov. **7** (2012): 154-167
- Zubor, P. y col., Mol.Biol.Rep. **42** (2015): 977-988
- Zuniga-Garcia, V. y col., Dig.Dis.Sci. (2015)
- Zurawa-Janicka, D. y col., Oncol Rep. **28** (2012): 1838-1844
- Follenzi A, y col. Nat Genet. 2000 Jun;25(2):217-22.
- Zufferey R, y col. J Virol. 1999 Apr;73(4):2886-92.
- Scholten KB, y col. Clin Immunol. 2006 May;119(2):135-45.
- Gustafsson C, y col. Trends Biotechnol. 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
- Kuball, J., y col. (2007). *Blood* 109, 2331–2338.
- Schmitt, T. M., y col. (2009). *Hum. Gene Ther.* 20, 1240–1248

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Péptidos y combinación de péptidos y andamiajes novedosos para su uso en inmunoterapia contra carcinoma de células renales (rcc) y otros cánceres

<130> I32806AR

<150> GB 1505585.8

<151> 2015-03-31

<150> US 62/140,767

<151> 2015-03-31

<160> 153

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Leu Ile Val Ser Leu Pro Tyr Leu
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Leu Trp Arg Glu Val Val Thr Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Leu Leu Gly Glu Val Gln Ala Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Leu Ser Gln Asp Ile Ile Thr Val
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Leu Tyr Pro Asn Leu Thr Arg Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Leu Phe Glu Leu Ser Lys Thr Val
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Phe Leu Leu Ser Leu Ile Asp Arg Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Leu Ala Ser Phe Lys Ser Phe Leu
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Leu Leu Gln Lys Pro Asp Ser Val

1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Lys Leu Leu Gln Asn Asn Tyr Gly Leu
 1 5

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Phe Ile Gln Thr Glu Ala Pro Lys Glu Val
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile
 1 5 10

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Ile Met Ala Gln Ile Leu Thr Val
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Leu Leu Thr Glu Thr Ile Phe Leu
 1 5

<210> 15

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Leu Ile Lys His Leu Val Lys Val
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Phe Met Pro Glu Glu Leu Pro Gln Leu
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Ile Leu Ala Gln Gln Val His Ala Leu
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Val Leu Asp Leu Ala Ala Lys Val
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Leu Asp Pro Gly Ser Leu Gln Leu
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Val Ala Asn Thr Thr Phe Thr Val
1 5

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Leu Ile Gln Gly Asp Gln Ile Leu Ser Val
1 5 10

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Phe Leu Ser Pro Pro Leu Pro Ser Val
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Ile Gln Glu Val Val Gln Tyr Ile
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Phe Thr Leu Gly Thr Thr Val Phe Leu
1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Leu Val Pro Ala His Leu Val Ala Ala
1 5 10

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Leu Met Glu Ile Leu Tyr Thr Leu
 1 5

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Ser Leu Ser Asp Leu Leu Val Ser Leu
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Phe Ile Ala Asp Leu Val Val Gly Leu
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Ile Leu Leu Asp Leu Glu Gln Ala Leu
 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Leu Phe Tyr Thr Lys Ile Phe Leu
 1 5

<210> 31
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Val Leu Phe Gly Leu Asp Pro Ala Val Ile Lys Val
 1 5 10

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Phe Leu Ala Gly Gly Ile Arg Gly Ser Gly Ala
 1 5 10

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Ile
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Glu Leu Asn Asn Gln Asn Phe Tyr Leu
 1 5

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Val Leu His Ser Leu Gln Thr Gln Leu
 1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Leu Phe Gly Lys Lys Tyr Ile Leu
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Val Leu Ala Pro Val Ile Leu Met Leu
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Val Leu Leu Asp Thr Ile Leu Gln Leu
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Tyr Leu Leu Asn Leu Asn His Leu Gly Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Tyr Ile Gln Glu His Leu Leu Gln Ile
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Leu Leu Lys Thr Leu Gln Lys Leu
1 5

<210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Val Ile Leu Asp Thr Gly Thr Ile Gln Leu
 1 5 10

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Tyr Leu Lys Asp Glu Leu Asp Glu Leu
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Leu Phe Ser Phe Val Thr Ala Leu
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Thr Leu
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Leu Ser Glu Val Leu Val Gln Ile
 1 5

<210> 47
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Thr Leu Ala Glu Val Arg Ala Val Gln Glu Ile
1 5 10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Val Val Ala Ser Asn Ile Met Glu Val
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Val Leu Ile Val Glu Val Pro Gly Val
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Leu Ser Asp His Ile Val Leu Leu
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Asn Leu Trp Pro Met Ile Leu Thr Leu
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ser Ile Leu Asp Ala Val Gln Arg Val
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Phe Leu Leu Glu Ile Arg Gln Thr Leu
1 5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Leu Val Ala Lys Gly Leu Val Gln Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Tyr Leu Ala Leu Ile Leu Pro Val Leu
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Ile Leu Met Asp Phe Ser Asn Ser Met
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Ser Leu Gln Lys Glu Ile Leu Tyr Leu
1 5

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Phe Leu Val Asp Phe Glu Gln Ser His Leu
 1 5 10

<210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val
 1 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Ile Leu Trp Lys Asp Ile Glu Tyr Val
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61

Ser Leu Met Gly Ile Leu Leu Arg Ile
 1 5

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Val Leu Ala Gly Pro Ala Phe Leu Val Gln Leu
 1 5 10

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Leu Ile Glu Asp His Phe Asp Val Thr Val
1 5 10

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Leu Ala Ala Ser Val Ala Leu Ala
1 5

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Val Thr Gly Ala
1 5 10

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Leu Leu Lys Thr Ile Ile Lys Val
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val
1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val

1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69

Ile Leu Ala Asp Leu Leu Pro Ser Leu
 1 5

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70

Ser Leu Thr Ala Leu Arg Leu Leu Leu
 1 5

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Ala Leu Asp Gly His Leu Tyr Ala Val
 1 5

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Ser Leu Glu Lys Val Phe Gly Ile
 1 5

<210> 73
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

Gly Leu Asp Gly Ile Pro Phe Thr Val
 1 5

<210> 74

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Leu Phe His Lys Gln Val Thr Val
 1 5

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75

Phe Leu Ile Lys Ser Ile Asn Leu Val
 1 5

<210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

Val Leu Ala Asp Asp His Leu Ile Glu Val
 1 5 10

<210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Leu Ile Lys His Lys Ile Met Leu
 1 5

<210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

Ala Leu Leu Asp Thr Val Val Gln Ala
 1 5

<210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Leu Ala Asp Ile Val Trp Arg Ala
1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Lys Leu Ala Ser Met Leu Glu Thr Leu
1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Lys Leu
1 5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Ser Leu Leu Gln Ala Thr Asp Phe Met Ser Leu
1 5 10

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Ile Gln Trp Ser Ile Val Pro Glu Val
1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Tyr Leu Met Asp Glu Gly Ala His Leu
1 5

<210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85

Phe Val Met Ser Glu Ile Arg Thr Val
 1 5

<210> 86
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86

Gly Leu Leu Gln Gly Lys Leu Ala Leu Leu
 1 5 10

<210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val
 1 5

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88

Thr Leu Ala Glu Leu His Ile Ser Leu
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89

Ser Leu Leu Leu Ala Val Thr Glu Val
 1 5

<210> 90
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Thr Leu Glu Lys Asn Phe Val Ile
 1 5

<210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 91

Met Leu Leu Ser Ser Leu Val Ser Leu
 1 5

<210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92

Phe Leu Phe Arg Asp Ile Leu Glu Leu
 1 5

<210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93

Gly Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
 1 5 10

<210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

Ile Leu His His Lys Val Tyr Asp Leu
 1 5

<210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95

Lys Leu Thr Asp Val Gly Ile Ala Thr Leu
1 5 10

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

Thr Leu Ala Glu Thr Leu Val Asn Leu
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

Thr Leu Ile Ser Glu Leu Val Gln Ala
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

Lys Ile Pro Pro Val Ser Pro Ser Ile
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

Gly Leu Ala Pro His Leu Glu Gln Ile
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

Lys Leu Asn Val Ala Pro Leu Ala Val
1 5

<210> 101
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101

His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
 1 5 10

<210> 102
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 102

Leu Leu Phe Asp Val His Thr Thr Leu
 1 5

<210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 103

Lys Leu Gln Asp Gly Leu Leu His Ile
 1 5

<210> 104
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 104

Ala Leu Phe Glu Gly Val Val Arg Gln Ile
 1 5 10

<210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Leu Ala Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala
 1 5 10

<210> 106
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Val Leu Met Asp Leu Lys Ala Leu Leu
1 5

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Val Leu Met Asp Leu Lys Ala Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Val Leu Ile Ser Val Leu Gln Ala Ile
1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Tyr Leu Trp Ser Arg Val Glu Lys Leu
1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Leu Leu Asp Leu His Ser Tyr Leu Leu
1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Thr Leu Leu Glu Thr Glu Met Leu Leu
1 5

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

Leu Leu Phe Asp His Leu Glu Pro Ile Glu Leu
1 5 10

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

Ser Leu Phe Asp Trp Asn Val Lys Leu
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Ala Leu Ala Val Asn Ile Ser Ala Ala
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu
1 5

<210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 117

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu
 1 5

<210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu
 1 5

<210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu
 1 5

<210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 120

Gly Leu Ala Gly Asp Asn Ile Tyr Leu
 1 5

<210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 121

Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val
 1 5

<210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Ser Leu Asp Pro Ser Ser Pro Gln Val
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Ile Leu Ser Pro Leu Ser Val Ala Leu
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Lys Leu Asp Pro Thr Lys Thr Thr Leu
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu

1 5

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 128

Tyr Leu Glu Glu Asp Val Tyr Gln Leu
 1 5

<210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 129

Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala
 1 5

<210> 130
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 130

Ala Leu Pro Thr Val Leu Val Gly Val
 1 5

<210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 131

Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
 1 5

<210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 132

Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val
 1 5

<210> 133

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 133

Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu
 1 5

<210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 134

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val
 1 5

<210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 135

Val Val Asp Glu Gly Pro Thr Gly Val
 1 5

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 136

Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val
 1 5

<210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 137

Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val
 1 5

<210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 138

Ser Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val
1 5

<210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Ile Leu Asn Val Asp Gly Leu Ile Gly Val
1 5 10

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser Val
1 5

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Leu Leu Val Asp Asp Ser Phe Leu His Thr Val
1 5 10

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val
1 5

<210> 143

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 144
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 144

Arg Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val
 1 5 10

<210> 145
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 145

Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val
 1 5

<210> 146
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 146

Lys Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu
 1 5 10

<210> 147
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 147

Ala Leu Ala Asp Lys Glu Leu Leu Pro Ser Val
 1 5 10

<210> 148
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 148

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
 1 5

<210> 149
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149

Ser Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val
 1 5 10

<210> 150
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 150

Thr Leu Met Pro Asn Ile Asn Lys Leu
 1 5

<210> 151
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 151

Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Arg Ile
 1 5 10

<210> 152
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 152

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 153

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido CARACTERIZADO PORQUE comprende una secuencia de aminoácidos que se elige del grupo que consiste en SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 114, y secuencias variantes de las mismas que son por lo menos 88% homólogas a SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 114; y una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, en donde dicho péptido no es un polipéptido de longitud completa.

2. El péptido de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula de MHC de clase I o II, y en donde dicho péptido, cuando se une a dicha MHC, es capaz de ser reconocido por las células T CD4 y/o CD8, y en donde dicha variante se une a una o más moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y/o induce la reactividad cruzada de las células T con dicho péptido variante.

3. El péptido o variante del mismo de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, CARACTERIZADO PORQUE la secuencia de aminoácidos del mismo comprende un tramo continuo de aminoácidos de acuerdo a cualquiera de SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 114.

4. El péptido o variante del mismo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADO PORQUE dicho péptido o variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 16 aminoácidos, y más preferiblemente en donde el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo a cualquiera de SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 114.

5. El péptido o variante del mismo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, CARACTERIZADO PORQUE dicho péptido se modifica y/o incluye enlaces no peptídicos.

6. El péptido o variante del mismo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, CARACTERIZADO PORQUE dicho péptido es parte de una proteína de fusión, en particular que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariante (II) asociada a antígeno de HLA-DR.

7. Un ácido nucleico, CARACTERIZADO PORQUE codifica para un péptido o