

I32811WO

Nuevos péptidos y nuevas combinaciones de péptidos y de soportes para el uso en la inmunoterapia contra el carcinoma colorrectal y otros tipos de cáncer

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

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más frecuente en los varones y el segundo más frecuente en las mujeres. En todo el mundo, el cáncer colorrectal supone en torno al 10% de todos los nuevos casos diagnosticados de cáncer. En 2012 se diagnosticaron 36 millones de casos nuevos con 746.000 casos en varones y 614.000 casos en mujeres, lo que da como resultado un cociente masculino-femenino de 1,2:1 (World Cancer Report, 2014)El cáncer colorrectal es una enfermedad de la vejez. .

La media de edad en el momento del diagnóstico es 68 años (SEER Stat facts, 2014).

Los porcentajes de incidencia varían geográficamente hasta 10 veces, con semejanzas entre varones y mujeres. La incidencia máxima en ambos sexos aparece en Australia y Nueva Zelanda (tasa de incidencia ajustada a la edad (ASR) = 45 por 100.000 varones y ASR = 32 por 100.000 mujeres). Las incidencias en Europa muestran una pequeña variación regional y un ASR = 38 por 100.000 varones y ASR = 25 por 100.000 mujeres. La menor incidencia del mundo se da en África Oriental, con 4,5 por 100.000 varones y 3,8 por 100.000 mujeres (World Cancer Report, 2014).

La supervivencia global a 5 años del cáncer colorrectal ronda el 65%. Con todo, los índices de supervivencia dependen del momento del diagnóstico. La supervivencia a 5 años del cáncer colorrectal localizado es del 89,8%, la del regional del 70,5% y la del metastásico a distancia del 12,9%. El cáncer colorrectal constituye la cuarta causa de muerte por cáncer (649.000 decesos; 8,5%) (SEER Stat facts, 2014; World Cancer Report, 2014).

El cáncer colorrectal se estadifica normalmente con el sistema, que incorpora información sobre el tamaño del tumor primario (T), la afectación de los ganglios linfáticos (N) y la aparición de metástasis a distancia (M). La estadificación de la UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) se basa en el sistema TNM e incluye datos estadísticos para la predicción del pronóstico (Stintzing, 2014).

Los factores de riesgo del cáncer colorrectal incluyen los hábitos de vida, la predisposición hereditaria y las afecciones inflamatorias. El consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo y la obesidad están asociados con un riesgo elevado de contraerlo. Los factores de riesgo hereditario son la aparición en la familia de casos de cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa familiar (FAP), la FAP atenuada (AFAP)/ poliposis adenomatosa del colon (AAPC), el carcinoma colorrectal sin poliposis hereditario (HNPCC) y los síndromes de poliposis hamartomatosas. Las afecciones inflamatorias

que conllevan un aumento del riesgo de cáncer colorrectal son las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Baena and Salinas, 2015; Stintzing, 2014; Vasen et al., 2015).

Desde el punto de vista de la histología, más del 90% de los casos de cáncer colorrectal son adenocarcinomas. Otros tipos raros de cáncer colorrectal son carcinomas neuroendocrinos, epidermoides, adenoescamosos, de células fusiformes e indiferenciados (Fleming et al., 2012). La mayoría de los adenocarcinomas colorrectales derivan de lesiones adenomatosas o displásicas precursoras. Según el tipo de lesión/carcinoma, los mecanismos moleculares de la oncogenia difieren. La vía de la inestabilidad cromosómica (CIN) (vía «supresora») se caracteriza por mutaciones en los genes APC, KRAS o p53. Se han hallado otras mutaciones en los genes LKB1/STK11, SMAD4, BMPR1A o MYH. La vía de la inestabilidad de los microsatélites (MSI) (vía «mutadora») comprende mutaciones en los genes de reparación de los desemparejamientos (MMR) del ADN MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, la hipermetilación del gen MMR o mutaciones en BRAF. La inestabilidad epigenética, a través de la metilación del ADN, la alteración de las histonas y la remodelación de la cromatina, es característica de los tumores CIMP (fenotipo metilador de las islas de CpG) (Fleming et al., 2012).

Existen diversos tratamientos estándar para el cáncer colorrectal que dependen del estadio del tumor. Las opciones habituales incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y tratamientos dirigidos (Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b).

La extirpación del tumor es esencial para el tratamiento de este cáncer. Las condiciones anatómicas de los carcinomas rectales difieren de las de otros tumores colorrectales puesto que el recto está ubicado en la pelvis y el acceso al tumor puede ser difícil. Los tumores rectales pequeños y bien diferenciados (estadio T1) se extirpan sin ningún tratamiento de quimioterapia posterior. Los pacientes con tumores rectales de estadio T más elevado reciben quimiorradioterapia neoadyuvante con una fluoropirimidina antes de la excisión mesorrectal total (EMT) y quimioterapia adyuvante. Para el tratamiento

quimioterápico se usan los fármacos capecitabina o 5-fluorouracilo (5-FU). Para la quimioterapia combinacional se recomienda un cóctel a base de 5-FU, leucovorina y oxaliplatino (FOLFOX) (Stintzing, 2014; Berman et al., 2015b).

El tratamiento de los carcinomas de colon implica la hemicolectomía radical y la extirpación de ganglios linfáticos. Los primeros estadios (UICC estadio I) no requieren tratamiento adicional. Los pacientes con tumores de UICC en estadio II reciben 5-FU o capecitabina. El tratamiento para los pacientes con UICC en estadio III consiste en los regímenes FOLFOX y XELOX (capecitabina más oxaliplatino) (Berman et al., 2015a; Stintzing, 2014).

El cáncer colorrectal irresecable y metastásico es tratado con regímenes quimioterápicos como FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecán), FOLFOX, FOLFOXIRI (5-FU, irinotecán y oxaliplatino), FOLFOX/capecitabina, FOLFOX/oxaliplatino, FOLFIRI/capecitabina e irinotecán o UFT (5-FU y tegafur con uracilo) (Stintzing, 2014).

Además de los quimioterápicos, a los pacientes con enfermedad avanzada se les están administrando diversos anticuerpos monoclonales que actúan contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, cetuximab o panitumumab) o el factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A o bevacizumab). Para el tratamiento de segunda línea y posterior se pueden usar el inhibidor del VEGF aflibercept, el inhibidor de tirosina-cinasa regorafenib y el inhibidor de la timidilato-sintetasa TAS-102 o el inhibidor de la dUTPasa TAS-114 (Stintzing, 2014; Wilson et al., 2014).

Los ensayos clínicos más recientes analizan la inmunoterapia activa como opción terapéutica contra el CCR. Dichas estrategias incluyen la vacunación con péptidos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA), células tumorales enteras, vacunas a bases de células dendríticas (CD) y vectores virales (Koido et al., 2013).

Las vacunas peptídicas se han dirigido hasta el momento contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), mucina 1, EGFR, el antígeno 3 del carcinoma epidermoide

reconocido por linfocitos T (SART3), la gonadotropina coriónica beta humana (beta-hCG), el antígeno del tumor de Wilms 1 (WT1), survivina-2B, MAGE3, p53, proteína con dedo anular 43 y translocasa de la membrana mitocondrial externa 34 (TOMM34), o KRAS mutada. En varios ensayos clínicos de fase I y II los pacientes presentaron respuestas de LTC específicos de antígeno o la producción de anticuerpos. En contraste con las respuestas inmunitarias, muchos pacientes no obtuvieron beneficio clínico de las vacunas peptídicas (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

Las vacunas con células dendríticas comprende CD estimuladas con péptidos derivados de TAA, o con lisados de células tumorales, células tumorales apoptóticas, ARN del tumor o bien con productos de fusión entre células tumorales y CD. Si bien muchos participantes en estudios de fase I/II mostraron respuestas inmunitarias específicas, solo en una minoría redundó en beneficio clínico (Koido et al., 2013).

Las vacunas con células tumorales enteras consisten en células tumorales modificadas para segregar GM-CSF, modificadas con radiación o células irradiadas e infectadas con virus. La mayoría de los pacientes no mostró ningún beneficio clínico en varios ensayos de fase II/ III (Koido et al., 2013).

El virus vacunal y el poxvirus aviar con replicación defectuosa que codifican el CEA así como el B7.1, ICAM-1 e IFA-3 han sido usados como vehículos en vacunas con vectores víricos en ensayos clínicos de fase I. Un estudio distinto recurrió a un virus no replicativo de la viruela del canario que codificaba a CEA y B7.1. Aparte, con la inducción de respuestas de linfocitos T específicos del CEA, el 40% de los pacientes presentó respuestas clínicas objetivas (Horig et al., 2000; Kaufman et al., 2008).

A la vista de los graves efectos secundarios y del coste que comporta el tratamiento del cáncer, existe la necesidad de descubrir factores que puedan ser usados para el tratamiento del cáncer en general y, en particular, del cáncer colorrectal, incluido el de tipo amicrocítico. Existe asimismo la necesidad de descubrir factores que puedan servir como biomarcadores del cáncer en general y del cáncer colorrectal en particular, con

vistas a mejorar el diagnóstico, la valoración del pronóstico y la predicción del éxito terapéutico.

La inmunoterapia antitumoral representa una opción de tratamiento dirigido contra la células cancerosas que reduce los efectos secundarios. La inmunoterapia antitumoral aprovecha la existencia de los antígenos asociados a tumores. La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores (TAA) comprende los siguientes grupos principales:

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

b) Antígenos de diferenciación: Estos TAA son compartidos por los tumores y por el tejido normal del que deriva el tumor. La mayoría de los antígenos de diferenciación conocidos se halla en los melanomas y en los melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son la tirosinasa y Melan-A/MART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.

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

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

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

f) Proteínas de oncovirus: Estos TAA son proteínas virales que podrían desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y que, como extrañas a causa de su origen no humano, pueden desencadenar una respuesta de los linfocitos T. Ejemplos de tales proteínas son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

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

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

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

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

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos derivados de los antígenos asociados a tumor (TAA) reviste gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen

respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic et al., 2003). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Mortara et al., 2006) que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos o granulocitos.

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

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

Los linfocitos T cooperadores, activados por epítopos de MHC de clase II, desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítopos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores aun sin el concurso de los linfocitos T CD8-positivos a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN- γ). Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan

directamente como agentes efectores antitumorales (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

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

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

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

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

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

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

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluidas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de linfocitos T que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o están basados en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales. No obstante, la identificación de genes sobreexpresados

o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítomos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítomo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, en una forma de realización muy preferida de la invención es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos que sean presentados en exceso o de forma selectiva contra los cuales se encuentre un linfocito T funcional y/o proliferativo. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

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

RESUMEN DE LA INVENCION

En un primer aspecto de la presente invención, ésta se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 191 o a una secuencia variante de la misma que es homóloga al menos en un 77%, preferiblemente al menos un 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 77% o al menos en un 88%) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191, en que dicha variante se une a MHC y/o estimula linfocitos T que presentan reactividad cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido el polipéptido entero del que derivaría.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de la presente invención que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 191 o una variante de las mismas, que es homóloga al menos en un 77%, preferiblemente al menos en un 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 77% o al

menos en un 88%) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191, en que dicho péptido o una variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente de entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

Las tablas siguientes muestran los péptidos conformes con la presente invención, sus respectivas SEQ ID N.º, y los probables genes originarios (subyacentes) de tales péptidos. Todos los péptidos de la Tabla 1 y la Tabla 2 se unen a los alelos HLA-A*02. Los péptidos de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Tabla 2 han sido dados a conocer con anterioridad en grandes listados resultantes del cribado genético ultrarrápido con elevadas tasas de error o son el resultado del cálculo con algoritmos, pero no habían sido vinculados en absoluto con el cáncer hasta ahora. Los péptidos de la Tabla 3 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos de la invención. Los péptidos de la Tabla 4A y B son además útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de otros tipos de neoplasias malignas en las que interviene una sobreexpresión o una presentación en exceso del respectivo polipéptido originario.

Tabla 1: Péptidos conformes a la presente invención

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
1	ALIKQLFEA	168417, 441234, 89958	ZNF679, ZNF716, SAPCD2
2	ALLPRYFFL	23120	ATP10B
3	RLIPDTLYSV	1303	COL12A1
4	RLAELTVDEFL	26155, 401010	NOC2L, LOC401010
5	WLFDDGGLTL	6557, 6558, 6559	SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3
6	FLAELPGSLSL	5326	PLAGL2
7	YLTRHLAVL	4583	MUC2
8	ALMLQGVDLL	3329	HSPD1
9	ILDDHLRV	8313	AXIN2
10	RMYNKIFAI	80201	HKDC1
11	YLFEKTFNM	90161	HS6ST2
12	ALVQGILERV	4843	NOS2
13	FLLAEDTKV	10592	SMC2
14	FLDKPEDVLL	2036	EPB41L1
15	LQLDKEFQL	24140	FTSJ1
16	VLVDQSWVL	5655	KLK10

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
17	ALAAARVEL	6558	SLC12A2
18	FLSSLKGGLL	83608	C18orf21
19	RLYTKLLNEA	4651	MYO10
20	YLKDGDVML	11180	WDR6
21	VLIDHRWVL	43849	KLK12
22	GLIDEVMVL	54905	CYP2W1
23	FLDANGHFV	54905	CYP2W1
24	VLDGVLMEL	4190	MDH1
25	SLADRLIGV	57535	KIAA1324
26	GLASKENFSNVSL	6840	SVIL
27	LLADEDSSYL	51510	CHMP5
28	ALTEIQEFI	5591	PRKDC
29	QMLDVAIRV	8943	AP3D1
30	GLSSAYGGL	10787, 3856, 728638	NCKAP1, KRT8, KRT8P3
31	LLYGKYVSV	84065	TMEM222
32	KLNTETFGV	149986	LSM14B
33	ALWEKNTHL	11190	CEP250
34	ILLEKSVSV	80728	ARHGAP39
35	KLLDLTVRI	10562	OLFM4
36	GLLESPSIFNFTA	23185	LARP4B
37	GLFAGLGGAGA	10916	MAGED2
38	SLAPTPVSA	8870	IER3
39	GLNGGSPAAA	1045	CDX2
40	ALSNVIHKV	5268	SERPINB5
41	ILDDSFKLL	9843	HEPH
42	SILDDSFKL	9843	HEPH
43	TLDAAQPRV	6649	SOD3
44	SLESKLTSV	9289	GPR56
45	ALAELLHGA	26470	SEZ6L2
46	GLDDRYSLV	11187	PKP3
47	KLYERCEVV	2065	ERBB3
48	FLDASDPAL	65266	WNK4
49	SGMGGITAV	3856	KRT8
50	TLMAEMHVV	2186	BPTF
51	QVWEIQHTV	26290	GALNT8
52	ALDSSNSMQTI	3875	KRT18
53	FLLGSEIKL	54885	TBC1D8B
54	ALLNGEYLLAA	57418	WDR18
55	QIITSVVS	5378	PMS1

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
56	VLFTDEGVPKFL	4731	NDUFV3
57	NLLEKENYL	5318	PKP2
58	AMADKMDMSL	10189	ALYREF
59	LLTDNVVKL	79810	PTCD2
60	VLDEDEPRFL	23287	AGTPBP1
61	KLLKLFQGV	26058	GIGYF2
62	YLAPENGYL	6625	SNRNP70
63	KLFSILSTV	54919	HEATR2
64	KTLGKLWRL	30812, 6662, 6663	SOX8, SOX9, SOX10
65	FGAPGIISA	5725	PTBP1
66	GLDDGPDFL	58533	SNX6
67	SLNDLEKDVMLL	6597	SMARCA4
68	SILQFVHMV	5800	PTPRO
69	GMLNEAEGKAIKL	4629	MYH11
70	MISELEVR	4629	MYH11
71	RLWTEIPTAI	3710	ITPR3
72	YLLDYPNNLL	26057	ANKRD17
73	YLFDAVSM	51074	APIP
74	YLMGFLHAV	23779, 553158, 55615	ARHGAP8, PRR5-ARHGAP8, PRR5
75	EMIENIQSV	1080	CFTR
76	YLIGEKGHYL	7429	VIL1
77	SLLKRDFGA	1655	DDX5
78	ALDPELLLL	57805	KIAA1967
79	SLAADQLLKL	9295	SRSF11
80	QVDEVVDIMRV	3604, 6844, 9341	TNFRSF9, VAMP2, VAMP3
81	ALLSQQTHL	7050	TGIF1
82	QLYEEDTKL	10270	AKAP8
83	LTIEDGIFEV	3306, 3312, 100287551	HSPA2, HSPA8, HSPA8P8
84	SMVEDITGLRL	1832	DSP
85	ILHDINSDGVL	4924	NUCB1
86	KVFPKGISV	56667	MUC13
87	LLFDAPDLRL	55561	CDC42BPG
88	KLDIKVETV	55243	KIRREL
89	SLIEYEFRV	3655	ITGA6
90	GLLKPGNLVVL	10969	EBNA1BP2
91	TVDVATPSV	8924	HERC2
92	WIDDTSAFV	5073	PARN

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
93	SLQELRLLL	55502	HES6
94	KSMDIVLTV	4586, 727897	MUC5AC, MUC5B
95	AILDAHIEV	26290	GALNT8
96	KLYSRLVYV	387496	RASL11A
97	ALWWGVVTV	3784	KCNQ1
98	AMNGKSFSV	79572	ATP13A3
99	KLLEVDLDTV	4648	MYO7B
100	SLDDFLATA	55341	LSG1
101	GLSEGHTFQV	2318	FLNC
102	KILVSLIEV	10422	UBAC1
103	FLFGYPKRL	64110	MAGEF1
104	ILLTIKDDTIYL	4583	MUC2
105	YALDLSTFL	8870	IER3
106	SLISEKILL	26504	CNNM4
107	ALLGGGPYML	80004	ESRP2
108	SLAELVPGVGGI	9742	IFT140
109	ALDGDQMEL	3192	HNRNPU
110	LLGELPRLLLL	1604	CD55
111	HMDDGGYSM	27316, 494115	RBMX, RBMXL1
112	KLGQVLIYL	51809	GALNT7
113	ILYDLQQNL	3783	KCNN4
114	TAVGHALVL	1293	COL6A3
115	SLFDVSHML	275	AMT
116	LVYQFVHPI	25803	SPDEF
117	TLQPVDNSTISL	1266	CNN3
118	LLADLKTMOV	5141, 5142, 5143, 5144	PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D
119	ILYQTVTGL	83732	RIOK1
120	VLYEGVDEV	93432	MGAM2
121	SLAPNIISQL	25824	PRDX5
122	SLMGMVLKL	11169	WDHD1

Tabla 2: Péptidos adicionales conformes a la presente invención sin previa relación conocida con el cáncer – J = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
123	KTLEERSYLL	6240	RRM1
124	RVLPPSALQSV	9212	AURKB
125	KLGDFGLLVEL	9088	PKMYT1
126	TLAKYLMEL	891, 9133	CCNB1, CCNB2

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
127	RLAELTVDEFLA	26155	NOC2L
128	MLDDRAYLV	23511	NUP188
129	VLIDVLKEL	23019	CNOT1
130	GLGGSQIDTHL	23215	PRRC2C
131	KLLDVVHPA	10574	CCT7
132	ALLNAILHSA	25926	NOL11
133	RTFEKIEEV	3978	LIG1
134	GVAGGSILKGV	1968, 255308	EIF2S3, LOC255308
135	KLQEEIPVL	1062	CENPE
136	KLFDIFSQQV	55737	VPS35
137	QLTEIKPLL	57446	NDRG3
138	KQFEGTVEI	675	BRCA2
139	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
140	LLNEILEQV	64151	NCAPG
141	AVIEHLERL	283459	GATC
142	SLVQRVETI	1894	ECT2
143	KLSDVWKEL	197259	MLKL
144	LLNDRIWLA	90204	ZSWIM1
145	LLLEVVKQV	65065	NBEAL1
146	ALSDETWGL	2886	GRB7
147	TLTELRAFL	8242	KDM5C
148	RLLENMTEVV	23042	PDXDC1
149	YQFDKVGILTL	8563	THOC5
150	RLADLEALKV	10535	RNASEH2A
151	SAQGSVDVSLTACK V	100507703, 3105	LOC100507703, HLA-A
152	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
153	ILFSEDSTKLFV	84916	CIRH1A
154	KLPSETIFVGC	50628	GEMIN4
155	RLLGEEVVRV	9894	TELO2
156	SLMMTIINL	7153	TOP2A
157	SLIERDLKL	9875	URB1
158	GLLDPSVFHV	79050	NOC4L
159	VLVDDDGIKVV	79022	TMEM106C
160	KLLEFDQLQL	8871	SYNJ2
161	FLKNELDNV	10293	TRAIP
162	KLMDYIDEL	85444	LRRCC1
163	RLLHEVQEL	10540	DCTN2
164	KMLDEILLQL	5425	POLD2
165	RLLDFPEAMVL	23113	CUL9

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
166	GLLEARGILGL	990	CDC6
167	SVIDHIHLISV	10755	GIPC1
168	GLIRFPLMTI	55643	BTBD2
169	YLAHFIEGL	64328	XPO4
170	ALAGGITMV	790	CAD
171	RLQETEGMVAV	10042	HMGXB4
172	LLLDVTVMQV	22820	COPG1
173	KLGDLMVLL	57647	DHX37
174	ILLDDNMQIRL	5261	PHKG2
175	TLLGGKEAQALGV	94059	LENG9
176	RTLDKVLEV	9933	KIAA0020
177	ALLQGAIESV	25894	PLEKHG4
178	YLFREPATI	4728	NDUFS8
179	RLLJPLSSA	125950	RAVER1
180	NLLEIAPHL	2820	GPD2
181	NLFDLGGQYLRV	22827	PUF60
182	SLNKWIFTV	339665	SLC35E4
183	TLQEVVTGV	55750	AGK
184	SLLDENNVSSYL	5591	PRKDC
185	VLYTGVRV	64682	ANAPC1
186	KMSEKILL	5690	PSMB2
187	GLHNVVYGI	23019	CNOT1
188	FLVDGPRVQL	90204	ZSWIM1
189	AISEVIGKITA	9183	ZW10
190	AMAEMVLQV	9918	NCAPD2
191	QLFSEIHNL	55755	CDK5RAP2

Tabla 3: Otros péptidos útiles para, por ejemplo, tratamientos personalizados contra el cáncer – J = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
192	KIQEMQHFL	4321	MMP12
193	KLSPTVVGL	8313	AXIN2
194	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
195	LLLGERVAL	23475	QPRT
196	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
197	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
198	VLYGPDVPTI	4680	CEACAM6
199	FLLEREQLL	165055	CCDC138
200	SAVDFIRTL	9263	STK17A

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
201	GJFNGALAAV	39	ACAT2
202	GLAALAVHL	2175	FANCA
203	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1
204	KLLDLETERILL	2803	GOLGA4
205	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
206	RIAGIRGIQGV	23167	EFR3A
207	KLCEGFNEV	51142, 646630	CHCHD2, CHCHD2P8
208	RLIDRIKTV	60560	NAA35
209	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
210	KLAVALLAA	3576	IL8
211	SLFGKKYIL	2274	FHL2
212	FLLDGSANV	1293	COL6A3
213	LLWAPTAQA	389812	LCN15
214	SVLEKEIYSI	127602	DNAH14
215	KLQEKIQEL	1062	CENPE
216	YLWDLDHGFAGV	832	CAPZB
217	KLLDTMVDTFI	100527963, 11243	PMF1-BGLAP, PMF1
218	KLSWDLIYL	51148	CERCAM
219	FLDEKGRCV	4583	MUC2
220	KMDPVAYRV	5859	QARS
221	ILNVDGLIGV	47	ACLY
222	GVIAEILRGV	10528	NOP56
223	VLMQDSRLYL	983	CDK1
224	QLQEGKNVIGL	8407	TAGLN2
225	YLYGQTTTYL	7153	TOP2A
226	FLVDGSWSV	1303	COL12A1
227	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
228	SMSGYDQVL	3187, 3188	HNRNPH1, HNRNPH2
229	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11, DDX12P, LOC642846
230	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
231	RLFADILNDV	64755	C16orf58
232	RLLDSVSRL	3918	LAMC2
233	RLDDLKMTV	3918	LAMC2
234	KMFESFIESV	5576	PRKAR2A
235	LLHEENFSV	6942	TCF20
236	KMSELQTYV	1063	CENPF
237	KLVEFDLGA	10460	TACC3
238	NMLEAVHTI	7272	TTK

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
239	QLIEKNWLL	56992	KIF15
240	VLAPRVLRA	5954	RCN1
241	ILIDWLVQV	891	CCNB1
242	RLEEDDGDVAM	10482	NXF1
243	TLMDMRLSQV	24148	PRPF6
244	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
245	QLIDYERQL	11072	DUSP14
246	GLTDNIHLV	25878	MXRA5
247	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y
248	ALYGDIDAV	5743	PTGS2
249	ALYGRLEV	23294	ANKS1A
250	ALCEENMRGV	1938	EEF2
251	SLLQATDFMSL	7070	THY1
252	YVYQNNIYL	2191	FAP
253	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
254	VLFQEALWHV	2194	FASN
255	ALALWIPSL	200634	KRTCAP3
256	GLLEELVTV	642475	MROH6
257	SLADFMQEV	23019	CNOT1
258	LLYEGKLT	440107	PLEKHG7
259	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
260	ALLAEGITWV	54499	TMCO1
261	YLYDSETKNA	4316	MMP7
262	VLAKPGVISV	1293	COL6A3
263	LLAGQTYHV	1293	COL6A3
264	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
265	LLDKKIGV	10576	CCT2

La presente invención, además, se refiere en general a los péptidos acordes con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, como por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel (CCM), melanoma, cáncer de ovario y cáncer de esófago.

Se prefieren especialmente los péptidos –solos o en combinación– conformes con la presente invención seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID

N.º 191. Se prefieren más los péptidos – solos o combinados – seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 68 (véase la Tabla 1), y sus usos en la inmunoterapia del cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario y cáncer de esófago, pero preferiblemente el cáncer colorrectal.

Se prefieren ante todo los péptidos – solos o en combinación – seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1, 3, 6, 11, 13, 16, 18, 19, 23, 24, 26, 31, 32, 34, 37, 40, 44, 45, 59, 67, 71, 82, 87, 88, 100, 103, 105, 113, 123, 124, 126, 129, 131, 132, 133, 135, 137, 140, 142, 150, 152, 153 y la SEQ ID N.º 166, y sus usos en la inmunoterapia del cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario y cáncer de esófago, pero preferiblemente en el cáncer colorrectal.

Tal y como se muestra a continuación en la Tabla 4A, muchos de los péptidos acordes con la presente invención también se encuentran en otros tipos de tumores y, por tanto, también pueden formar parte de la inmunoterapia para otras indicaciones. Véase también la Figura 1D y el ejemplo 1.

Tabla 4A: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas. La tabla expone los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumores adicionales bien sobrerepresentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente entre las medias geométricas del tejido tumoral y del tejido normal superior a 3. La sobrerepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal que muestra la presentación más elevada.

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
1	ALIKQLFEA	Pulmón, cerebro, ovario, esófago
3	RLIPDTLYSV	Pulmón, páncreas, mama, ovario, esófago
4	RLAELTVDEFL	Pulmón, ovario
6	FLAELPGSLSL	Pulmón, hígado, leucocitos, melanoma, ovario
8	ALMLQGVDLL	Páncreas, leucocitos
10	RMYNKIFAI	Hígado
11	YLFKTFNM	Pulmón, cerebro, esófago
13	FLLAEDTKV	Melanoma
15	LQLDKEFQL	Pulmón, esófago
16	VLVDQSWVL	Ovario
18	FLSSLKGGLL	Ovario
19	RLYTKLLNEA	Cerebro, esófago
25	SLADRLIGV	Próstata, ovario
26	GLASKENFSNVSL	Pulmón, hígado, esófago
29	QMLDVAIRV	Leucocitos
31	LLYGKYVSV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, leucocitos, ovario, esófago
33	ALWEKNTHL	Hígado, CCM
34	ILLEKSVSV	Ovario
37	GLFAGLGGAGA	Esófago
38	SLAPTPVSA	Páncreas
40	ALSNVIHKV	Pulmón, páncreas, esófago
44	SLESKLTSV	Cerebro, páncreas, ovario
45	ALAEELLHGA	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, próstata, mama, ovario
46	GLDDRYSLV	Esófago
47	KLYERCEVV	Hígado
48	FLDASDPAL	Riñón, próstata
53	FLLGSEIKL	Riñón, páncreas
54	ALLNGEYLLAA	Hígado, ovario, esófago
55	QIITSVVSV	Páncreas
56	VLFTDEGVPKFL	Pulmón, riñón, hígado
57	NLLEKENYL	Ovario
58	AMADKMDMSL	Cerebro, leucocitos, melanoma
59	LLTDNVVKL	Pulmón, hígado, esófago
61	KLLKLFQGV	Riñón
62	YLAPENGYL	Pulmón, hígado, melanoma, esófago

SEQ ID N.º.	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
63	KLFSILSTV	Cerebro, hígado, próstata, ovario, esófago
65	FGAPGIISA	Estómago, esófago
67	SLNDLEKDVMLL	Leucocitos, melanoma
69	GMLNEAEGKAIKL	Próstata
70	MISELEVR	Riñón, estómago, próstata, esófago
71	RLWTEIPTAI	Hígado
72	YLLDYPNNLL	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, leucocitos, mama, ovario, esófago
74	YLMGFLHAV	Ovario
76	YLIGEKQHYL	Hígado
77	SLLKRDFGA	Pulmón, mama
79	SLAADQLLKL	Pulmón, hígado
80	QVDEVVDIMRV	Leucocitos
81	ALLSQQTHL	Esófago
82	QLYEEDPTKL	Leucocitos, esófago
83	LTIEDGIFEV	Riñón, leucocitos, CCM, melanoma, esófago
84	SMVEDITGLRL	Pulmón, hígado, esófago
87	LLFDAPDLRL	Pulmón, ovario
88	KLDIKVETV	Pulmón, riñón, hígado, melanoma, ovario, esófago
89	SLIEYEFV	Hígado, esófago
90	GLLKPGNLVVL	Pulmón, esófago
91	TVDVATPSV	Mama, ovario
92	WIDDTSAFV	Melanoma
98	AMNGKSFSV	Hígado, esófago
101	GLSEGHTFQV	Próstata
102	KILVSLIEV	Pulmón, riñón, ovario, esófago
103	FLFGYPKRL	Cerebro, hígado, próstata
105	YALDLSTFL	Riñón, hígado
107	ALLGGGPYML	Pulmón
108	SLAELVPGVGGI	Riñón, cerebro, hígado, ovario
110	LLGELPRLLLL	Pulmón, páncreas, leucocitos
116	LVYQFVHPI	Páncreas, próstata, mama, ovario
117	TLQPVDNSTISL	Pulmón, riñón, hígado, páncreas, esófago
118	LLADLKTMTV	Cerebro, leucocitos, melanoma
119	ILYQTVTGL	Esófago
121	SLAPNIISQL	Hígado, leucocitos

SEQ ID N.º.	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
123	KTLEERSYLL	Pulmón, riñón, hígado, CCM, ovario, esófago
124	RVLPPSALQSV	Pulmón, hígado, CCM, melanoma, ovario, esófago
125	KLGDFGLLVEL	Pulmón, cerebro, melanoma, ovario, esófago
126	TLAKYLMEL	Pulmón, cerebro, hígado, ovario, esófago
127	RLAELTVDEFLA	Ovario
128	MLDDRAYLV	Pulmón, cerebro, mama, CCM, ovario, esófago
129	VLIDVLKEL	Riñón, leucocitos
131	KLLDVVHPA	Pulmón, cerebro, hígado, próstata, ovario
132	ALLNAILHSA	Pulmón, cerebro, hígado, ovario, esófago
133	RTFEKIEEV	Pulmón, riñón, cerebro, estómago, hígado, mama, CCM, ovario, esófago
134	GVAGGSILKGV	Pulmón, hígado, melanoma, ovario, esófago
135	KLQEEIPVL	Pulmón
136	KLFDIFSQQV	Hígado
137	QLTEIKPLL	Cerebro, ovario
138	KQFEGTVEI	Esófago
139	VLLNEILEQV	Pulmón, hígado, melanoma, ovario, esófago
140	LLNEILEQV	Pulmón, melanoma, ovario
141	AVIEHLERL	Pulmón, riñón, esófago
142	SLVQRVETI	Pulmón, riñón, hígado, melanoma, ovario, esófago
143	KLSDVWKEL	Pulmón
144	LLNDRIWLA	Esófago
145	LLLEVVKQV	Melanoma,
146	ALSDETWGL	Riñón, estómago, páncreas, mama, ovario
147	TLTELRAFL	Riñón
148	RLLNMTEVV	Hígado
149	YQFDKVGILTL	Leucocitos, melanoma
151	SAQGSDVSLTACKV	Pulmón
152	KLLAVIHEL	Pulmón, riñón, páncreas, ovario, esófago
153	ILFSEDSTKLFV	Pulmón, hígado, leucocitos, melanoma, ovario, esófago
154	KLPSETIFVGC	Pulmón, hígado, leucocitos, ovario, esófago
155	RLLGEEVVRV	Esófago

SEQ ID N.º.	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
156	SLMMTIINL	Pulmón, hígado, melanoma
157	SLIERDLKL	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, esófago
158	GLLDPSVFHV	Riñón, cerebro, hígado, esófago
159	VLVDDDGIKVV	Hígado, melanoma, ovario
160	KLLEFDQLQL	Pulmón, riñón, leucocitos, ovario
161	FLKNELDNV	Pulmón, hígado, leucocitos, mama, melanoma, ovario
162	KLMDYIDEL	Cerebro, esófago
163	RLLHEVQEL	Cerebro
164	KMLDEILLQL	Cerebro
165	RLLDFPEAMVL	Pulmón, ovario
166	GLLEARGILGL	Hígado
167	SVIDHIHLISV	Pulmón, melanoma, ovario
168	GLIRFPLMTI	Pulmón, riñón, hígado
169	YLAHFIEGL	Cerebro, hígado, leucocitos, esófago
170	ALAGGITMV	Pulmón, riñón, hígado, páncreas, melanoma, esófago
171	RLQETEGMVAV	Hígado, leucocitos, CCM
172	LLLDTVMTQV	Riñón, melanoma, ovario
173	KLGDLMVLL	Leucocitos
174	ILLDDNMQIRL	Hígado, melanoma, ovario
175	TLLGGKEAQALGV	Ovario
177	ALLQGAIESV	Melanoma, ovario, esófago
178	YLFREPATI	Pulmón, cerebro, hígado, próstata, melanoma, ovario, esófago
180	NLLEIAPHL	Cerebro, leucocitos, mama
181	NLFDLGGQYLRV	Cerebro, hígado, ovario
183	TLQEVVTGV	Próstata, mama
184	SLLDENNVSSYL	Pulmón, riñón, hígado, páncreas, próstata, CCM, melanoma, ovario, esófago
185	VLYTGVRV	Leucocitos, melanoma, ovario
186	KMSEKILL	Esófago
187	GLHNVVYGI	Próstata
188	FLVDGPRVQL	Mama, melanoma
189	AISEVIGKITA	Ovario
190	AMAEMVLQV	Pulmón
191	QLFSEIHNL	Cerebro, hígado
192	KIQEMQHFL	Pulmón, esófago
193	KLSPTVVGL	Hígado, ovario

SEQ ID N.º.	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
194	SLYKGLLSV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, ovario, esófago
195	LLLGERVAL	Hígado, ovario
197	SLFGQDVKAV	CCM, esófago
198	VLYGPDVPTI	Páncreas
199	FLLEREQLL	Riñón, leucocitos, melanoma
200	SAVDFIRTL	Mama, esófago
201	GJFNGALAAV	Cerebro, páncreas
202	GLAALAVHL	Melanoma, ovario, esófago
203	KLIDLSQVMYL	Pulmón, riñón, páncreas, ovario
204	KLLDLETERILL	Pulmón, hígado, próstata, ovario
205	RLHDENILL	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, páncreas, próstata, ovario, esófago
206	RIAGIRGIQGV	Pulmón, riñón, hígado, próstata, ovario
207	KLCEGFNEV	Cerebro, hígado
208	RLIDRIKTV	Pulmón, cerebro, hígado, ovario
209	KLQDGLLHI	Riñón, cerebro, hígado, páncreas
210	KLAVALLAA	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, esófago
211	SLFGKKYIL	Riñón
212	FLLDGSANV	Pulmón, páncreas, esófago
214	SVLEKEIYSI	Pulmón, hígado, próstata, mama, ovario, esófago
215	KLQEKIQEL	Pulmón, ovario, esófago
216	YLWDLDHGFAGV	Pulmón, cerebro, hígado, próstata, melanoma, ovario, esófago
217	KLLDTMVDFTL	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, ovario, esófago
218	KLSWDLIYL	Pulmón, riñón
220	KMDPVAYRV	Hígado, próstata
221	ILNVDGLIGV	Riñón, cerebro, hígado, próstata, leucocitos
222	GVIAEILRGV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado
223	VLMQDSRLYL	Pulmón
224	QLQEGKNVIGL	Páncreas
225	YLYGQTTTYL	Pulmón, riñón, estómago, hígado, melanoma, ovario, esófago
226	FLVDGSWSV	Pulmón, estómago, páncreas, mama, ovario, esófago
227	LTAPPEALLMV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, páncreas, leucocitos, ovario, esófago
228	SMSGYDQVL	Pulmón, leucocitos

SEQ ID N.º.	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
229	YLLEKFVAV	Pulmón, hígado, ovario
230	AMSSKFFLV	Pulmón, cerebro, estómago, hígado, páncreas, próstata, mama, ovario, esófago
231	RLFADILNDV	Pulmón, cerebro, hígado, próstata, CCM, ovario
232	RLLDSVSRL	Pulmón, riñón, hígado, páncreas, mama, ovario, esófago
233	RLDDLKMTV	Pulmón, riñón, páncreas, mama, ovario, esófago
234	KMFESFIESV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, próstata, ovario, esófago
235	LLHEENFSV	Pulmón, riñón, hígado, ovario, esófago
236	KMSELQTYV	Pulmón, páncreas, melanoma, ovario, esófago
237	KLVEFDLGA	Pulmón, cerebro, estómago, hígado, CCM, ovario, esófago
238	NMLEAVHTI	Pulmón, hígado, melanoma, ovario, esófago
239	QLIEKNWLL	Pulmón, hígado, leucocitos, ovario, esófago
240	VLAPRVLRA	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, páncreas, ovario
241	ILIDWLQV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, páncreas, ovario, esófago
242	RLEEDDGDVAM	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, páncreas, leucocitos, mama, melanoma
243	TLMDMRLSQV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, próstata, ovario
244	SLHFLILYV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, melanoma
245	QLIDYERQL	Pulmón, riñón, hígado, páncreas, mama, esófago
246	GLTDNIHLV	Pulmón, riñón, páncreas, mama, ovario, esófago
247	SLDTLMTYV	Pulmón, riñón, cerebro, páncreas, próstata, leucocitos, esófago
248	ALYGDIDAV	Pulmón, cerebro, páncreas, esófago
249	ALYGRLEV	CCM, ovario, esófago
250	ALCEENMRGV	Pulmón, riñón, cerebro, hígado, CCM, esófago
251	SLLQATDFMSL	Riñón, páncreas, esófago

SEQ ID N.º.	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
252	YVYQNNIYL	Pulmón, estómago, hígado, páncreas, mama, melanoma, ovario, esófago
253	KLLDEVTYLEA	Hígado
254	VLFQEALWHV	Hígado
255	ALALWIPSL	Pulmón, páncreas, ovario, esófago
256	GLLEELVTV	Pulmón, estómago, páncreas, ovario
257	SLADFMQEV	Pulmón, próstata, CCM, ovario
258	LLYEGKLT	Mama, ovario
259	ALADKELLPSV	Pulmón, riñón, hígado, páncreas, próstata, melanoma, ovario, esófago
260	ALLAEGITWV	Hígado
261	YLYDSETKNA	Riñón, hígado, páncreas, ovario, esófago
262	VLAKPGVISV	Pulmón, páncreas
264	RLLDVLAPLV	Riñón, hígado
265	LLDKKIGV	Riñón, ovario, esófago

Tabla 4B: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas (enmienda de la Tabla 4A). La tabla expone, como la Tabla 4A, los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumores adicionales bien sobrepresentados (incluida la presentación específica) en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente entre las medias geométricas del tejido tumoral y del tejido normal superior a 3. La sobrepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal que muestra la presentación más elevada. Los tejidos normales con los que se ha contrastado la sobrepresentación son los siguientes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, células sanguíneas, vaso sanguíneo, médula ósea, encéfalo, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroides, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroides, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
1	ALIKQLFEA	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
2	ALLPRYFFL	Cáncer de útero
3	RLIPDTLYSV	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
4	RLAELTVDEFL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
6	FLAELPGSLSL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
8	ALMLQGVDLL	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
11	YLF EKTFNM	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de vejiga urinaria
13	FLLAEDTKV	Cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano, cáncer de ovario
15	LQLDKEFQL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de páncreas
16	VLVDQSWVL	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
18	FLSSLKGGLL	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
19	RLYTKLLNEA	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
22	GLIDEVMVL	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
23	FLDANGHFV	Cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
25	SLADRLIGV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de útero
26	GLASKENFSNVSL	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
28	ALTEIQEFI	Cáncer de pulmón amicrocítico, Cáncer de cerebro, cáncer hepático, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
29	QMLDVAIRV	Cáncer de mama
31	LLYGKYVSV	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
32	KLNTETFGV	Cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de esófago, leucemia mieloide aguda
33	ALWEKNTHL	Cáncer de vejiga urinaria
34	ILLEKSVSV	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
35	KLLDLTVRI	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
36	GLLESPTSIFNFTA	Cáncer de mama
37	GLFAGLGGAGA	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
38	SLAPTPVSA	Cáncer de útero
40	ALSNVIHKV	Cáncer de vejiga urinaria
42	SILDDSFKL	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
43	TLDAAQPRV	Cáncer de próstata, cáncer de esófago
44	SLESKLTSV	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
45	ALAELLHGA	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
46	GLDDRYSLV	Cáncer de vejiga urinaria
47	KLYERCEVV	Melanoma
53	FLLGSEIKL	Cáncer hepático, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
54	ALLNGEYLLAA	Cáncer de pulmón amicrocítico, Cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
55	QIITSVVS	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
56	VLFTDEGVPKFL	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de ovario
58	AMADKMDMSL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
59	LLTDNVVKL	Melanoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
61	KLLKLFQGV	Melanoma, leucemia mieloide aguda
62	YLAPENGYL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero,

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
		cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
63	KLFSILSTV	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hodgkiniano
64	KTLGKLWRL	Melanoma
66	GLDDGPDFL	Melanoma
67	SLNDLEKDVMLL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
71	RLWTEIPTAI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
72	YLLDYPNNLL	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hodgkiniano, cáncer de páncreas
74	YLMGFLHAV	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria
75	EMIENIQSV	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
77	SLLKRDFGA	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hodgkiniano
78	ALDPELLLL	Leucemia mieloide aguda
79	SLAADQLLKL	Cáncer de útero
80	QVDEVVDIMRV	Leucemia mieloide aguda
81	ALLSQQTHL	Cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
82	QLYEEDTKL	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
83	LTIEDGIFEV	Linfoma no hodgkiniano
84	SMVEDITGLRL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hodgkiniano
87	LLFDAPDLRL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
88	KLDIKVETV	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria
90	GLLKPGLNVL	Cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
91	TVDVATPSV	Leucemia linfocítica crónica
93	SLQELRLLL	Cáncer de pulmón microcítico
97	ALWWGVVTV	Leucemia linfocítica crónica

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
98	AMNGKSFSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
99	KLLEVDLDTV	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda
100	SLDDFLATA	Cáncer de páncreas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
102	KILVSLIEV	Linfoma no hodgkiniano
103	FLFGYPKRL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
105	YALDLSTFL	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
107	ALLGGGPYML	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
108	SLAELVPGVGGI	Cáncer de mama
109	ALDGDQMEL	Leucemia mieloide aguda
110	LLGELPRLLLL	Melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
113	ILYDLQQNL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
114	TAVGHALVL	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
116	LVYQFVHPI	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
117	TLQPVDNSTISL	Cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
118	LLADLKTMV	Linfoma no hodgkiniano
119	ILYQTVTGL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
120	VLIEGVDEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
121	SLAPNIISQL	Leucemia mieloide aguda
123	KTLERSYLL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano, cáncer de páncreas

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
124	RVLPPSALQSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano, cáncer de páncreas
125	KLGDFGLLVEL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, cáncer de páncreas
126	TLAKYLMEL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
127	RLAELTVDEFLA	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
128	MLDDRAYLV	Cáncer de páncreas
129	VLIDVLKEL	Melanoma, linfoma no hodgkiniano
130	GLGGSQIDTHL	Cáncer de esófago, cáncer de útero
131	KLLDVVHPA	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
132	ALLNAILHSA	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hodgkiniano, cáncer de páncreas
133	RTFEKIEEV	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
134	GVAGGSILKGV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hodgkiniano
135	KLQEEIPVL	Cáncer de mama, melanoma, linfoma no hodgkiniano
136	KLFDIFSQQV	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hodgkiniano
137	QLTEIKPLL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
138	KQFEGTVEI	Leucemia linfocítica crónica, linfoma no hodgkiniano
139	VLLNEILEQV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero,

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
		leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano, cáncer de páncreas
140	LLNEILEQV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
142	SLVQRVETI	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hodgkiniano
143	KLSDVWKEL	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
144	LLNDRIWLA	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de útero
145	LLLEVVKQV	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hodgkiniano
146	ALSDETWGL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
147	TLTELRAFL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hodgkiniano
148	RLLNMTEVV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hodgkiniano
149	YQFDKVGILTL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de riñón, Cáncer de cerebro
150	RLADLEALKV	Cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hodgkiniano
152	KLLAVIHEL	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
153	ILFSEDSTKLFV	Cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hodgkiniano
154	KLPSETIFVGC	Melanoma, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
155	RLLGEEVVRV	Melanoma
156	SLMMTIINL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano, cáncer de ovario
158	GLLDPSVFHV	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
159	VLVDDDGIVV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hodgkiniano
160	KLLEFDQLQL	Cáncer de pulmón microcítico
161	FLKNELDNV	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
162	KLMDYIDEL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hodgkiniano
163	RLLHEVQEL	cáncer de riñón, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
164	KMLDEILLQL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de riñón, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
165	RLLDFPEAMVL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
166	GLLEARGILGL	Cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
167	SVIDHIHLISV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama
168	GLIRFPLMTI	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
169	YLAHFIEGL	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de ovario
170	ALAGGITMV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
171	RLQETEGMVAV	Melanoma, cáncer de ovario
172	LLLDTVMTQV	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda
173	KLGDLMVLL	Melanoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
174	ILLDDNMQIRL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
177	ALLQGAIESV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
178	YLFREPATI	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de páncreas

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
179	RLLJPLSSA	Leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer hepático, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de ovario, cáncer de esófago, Cáncer de cerebro, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de útero
180	NLLEIAPHL	Cáncer de pulmón amicrocítico, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda
181	NLFDLGGQYLRV	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
182	SLNKWIFTV	Melanoma
183	TLQEVVTGV	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hodgkiniano
184	SLLDENNVSSYL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano, cáncer de ovario
185	VLYTGVRV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de esófago, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
186	KMSEKILL	Melanoma
187	GLHNVVYGI	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hodgkiniano
188	FLVDGPRVQL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
189	AISEVIGKITA	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, cáncer de páncreas
190	AMAEMVLQV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano
191	QLFSEIHNL	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, leucemia mieloide aguda, linfoma no hodgkiniano, cáncer de páncreas

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención acorde con las SEQ ID N.º 1, 3, 4, 6, 11, 15, 26, 31, 40, 45, 56, 59, 62, 72, 77, 79, 84, 87, 88, 90, 102, 107, 110, 117, 123, 124,

125, 126, 128, 131, 132, 133, 134, 135, 139, 140, 141, 142, 143, 151, 152, 153, 154, 156, 157, 160, 161, 165, 167, 168, 170, 178, 184, 190, 192, 194, 203, 204, 205, 206, 208, 210, 212, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 223, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 250, 252, 255, 256, 257, 259 y 262 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de pulmón.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención acorde con las SEQ ID N.º 1, 11, 19, 31, 44, 45, 58, 63, 72, 103, 108, 118, 125, 126, 128, 131, 132, 133, 137, 157, 158, 162, 163, 164, 169, 178, 180, 181, 191, 194, 201, 205, 207, 208, 209, 210, 216, 217, 221, 222, 227, 230, 231, 234, 237, 240, 241, 242, 243, 244, 247, 248 y 250 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de cerebro.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención acorde con las SEQ ID N.º 65, 70, 133, 146, 225, 226, 230, 237, 252 y 256 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de estómago.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 31, 45, 48, 53, 56, 61, 70, 72, 83, 88, 102, 105, 108, 117, 123, 129, 133, 141, 142, 146, 147, 152, 157, 158, 160, 168, 170, 172, 184, 194, 199, 203, 205, 206, 209, 210, 211, 217, 218, 221, 222, 225, 227, 232, 233, 234, 235, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 250, 251, 259, 261, 264 y 265 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de riñón.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 6, 10, 26, 31, 33, 45, 47, 54, 56, 59, 62, 63, 71, 72, 76, 79, 84, 88, 89, 98, 103, 105, 108, 117, 121, 123, 124, 126, 131, 132, 133, 134, 136, 139, 142, 148, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 161, 166,

168, 169, 170, 171, 174, 178, 181, 184, 191, 193, 194, 195, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 214, 216, 217, 220, 221, 222, 225, 227, 229, 230, 231, 232, 234, 235, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 250, 252, 253, 254, 259, 260, 261 y 264 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de hígado.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 3, 8, 38, 40, 44, 53, 55, 110, 116, 117, 146, 152, 170, 184, 198, 201, 203, 205, 209, 212, 224, 226, 227, 230, 232, 233, 236, 240, 241, 242, 245, 246, 247, 248, 251, 252, 255, 256, 259, 261 y 262 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de páncreas.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 25, 45, 48, 63, 69, 70, 101, 103, 116, 131, 178, 183, 184, 187, 204, 205, 206, 214, 216, 220, 221, 230, 231, 234, 243, 247, 257 y 259 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de próstata.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 6, 8, 29, 31, 58, 67, 72, 80, 82, 83, 110, 118, 121, 129, 149, 153, 154, 160, 161, 169, 171, 173, 180, 185, 199, 221, 227, 228, 239, 242 y 247 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento de la leucemia.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 3, 45, 72, 77, 91, 116, 128, 133, 146, 161, 180, 183, 188, 200, 214, 226, 230, 232, 233, 242, 245, 246, 252 y 258 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de mama.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 33, 83, 123, 124, 128, 133, 171, 184, 197, 231, 237, 249, 250 y 257 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del carcinoma de células de Merkel.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 6, 13, 58, 62, 67, 83, 88, 92, 118, 124, 125, 134, 139, 140, 142, 145, 149, 153, 156, 159, 161, 167, 170, 172, 174, 177, 178, 184, 185, 188, 199, 202, 216, 225, 236, 238, 242, 244, 252 y 259 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del melanoma.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 1, 3, 4, 6, 16, 18, 25, 31, 34, 44, 45, 54, 57, 63, 72, 74, 87, 88, 91, 102, 108, 116, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 131, 132, 133, 134, 137, 139, 140, 142, 146, 152, 153, 154, 159, 160, 161, 165, 167, 172, 174, 175, 177, 178, 181, 184, 185, 189, 193, 194, 195, 202, 203, 204, 205, 206, 208, 214, 215, 216, 217, 225, 226, 227, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 246, 249, 252, 255, 256, 257, 258, 259, 261 y 265 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de ovario.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 1, 3, 11, 15, 19, 26, 31, 37, 40, 46, 54, 59, 62, 63, 65, 70, 72, 81, 82, 83, 84, 88, 89, 90, 98, 102, 117, 119, 123, 124, 125, 126, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 141, 142, 144, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 162, 169, 170, 177, 178, 184, 186, 192, 194, 197, 200, 202, 205, 210, 212, 214, 215, 216, 217, 225, 226, 227, 230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 255, 259, 261 y 265 para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de esófago.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los péptidos acordes con la presente invención para –preferiblemente combinados– el tratamiento de una

enfermedad proliferativa seleccionada entre el grupo de cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario y cáncer de esófago.

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

La presente invención se refiere, además, a péptidos acordes con la presente invención en que cada uno de dichos péptidos consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191, preferiblemente la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 68 o una variante de dichas secuencias de aminoácidos.

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

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

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

Preferiblemente, dicho medicamento servirá como terapia celular, como vacuna o como proteína basada en un TCR soluble o un anticuerpo.

La presente invención concierne, además, al uso acorde con la presente invención, en que dichas células tumorales son de cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, (CCM), melanoma, cáncer de ovario y cáncer de esófago, pero preferiblemente de células de cáncer colorrectal.

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

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

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

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

AKAP8 (también llamado AKAP95) codifica un miembro de la familia de proteínas de anclaje para la cinasa A, que incluye proteínas estructurales que contienen un dominio de unión para la subunidad RI/RII de la proteína cinasa A (PKA) y que recluta a la PKA y a otras moléculas de señalización en localizaciones específicas de la célula. La AKAP8

se une a la subunidad reguladora RII-alfa de la PKA y podría intervenir en la condensación cromosómica durante la mitosis al dirigir la PKA y el complejo de la condensina hacia la cromatina (RefSeq, 2002). La expresión de la proteína AKAP8 aparece notablemente regulada al alza en el cáncer de recto y de pulmón y está relacionada con la diferenciación celular y el tipo histopatológico, lo cual apunta a su importante papel en el desarrollo y la progresión del tumor. La expresión de la AKAP8 aparece correlacionada con la expresión de la ciclina E y la ciclina D (Chen et al., 2012; Hu et al., 2013; Qi et al., 2015).

ARHGAP39 (también llamado Vilse o CrGAP) codifica una proteína activadora de la GTPasa Rho que interviene en la guía por repulsión del axón mediada por el receptor *Roundabout* (Robo) y en la regulación de los cambios del citoesqueleto dependientes de RAC (Hu et al., 2005). La ARHGAP39 aparece con frecuencia regulada al alza en estirpes celulares de cáncer vesical (Matsuda et al., 2011). Interviene en la migración direccional de las células endoteliales (Kaur et al., 2008).

AURKB (también llamado AIM-1) codifica una aurora cinasa B, un miembro de la subfamilia de las aurora cinasas de las cinasas de serina y treonina. La AURKB regula con otras proteínas la segregación de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis a través de su asociación con los microtúbulos (RefSeq, 2002). La expresión de la AURKB está regulada al alza en distintos tipos de cáncer, entre ellos los de pulmón, colorrectal y mama así como en leucemias, en los que aparece vinculada con un pronóstico negativo. Así pues, el desarrollo de inhibidores de la AURKB es un campo interesante desde el punto de vista terapéutico (Hayama et al., 2007; Pohl et al., 2011; Hegyi et al., 2012; Goldenson and Crispino, 2015). La sobreexpresión de la AURKB ocasiona la fosforilación de la histona H3 y provoca inestabilidad cromosómica, un factor crucial para la carcinogenia (Ota et al., 2002; Tatsuka et al., 1998). La actividad de la AURKB potencia la transformación celular mediada por el oncogén Ras (Kanda et al., 2005).

C18orf21 (también llamado XTP13) codifica un péptido de la cadena beta de la hemoglobina que es anormal y está relacionado con la inhibición de la infección por el VIH (Liu et al., 2011a; Aschauer et al., 1983).

CCNB1 codifica la ciclina B1, una proteína reguladora implicada en la mitosis. Tiene dos transcritos alternativos: uno se expresa de forma constitutiva y el otro principalmente durante la fase G2/M (RefSeq, 2002). CCNB1 codifica la ciclina B1, una proteína reguladora implicada en la mitosis (RefSeq, 2002). CCNB1 es un conocido antígeno tumoral cuya sobreexpresión se ha descrito en el cáncer de mama, de cabeza y cuello, próstata, colorrectal, pulmón e hígado (Egloff et al., 2006). Se ha observado que el CCNB1 aparece regulado al alza en diversas entidades tumorales, tales como el cáncer colorrectal, de mama, pulmón y renal. La regulación a la baja de CCNB1 conduce a la detención del ciclo celular en la fase G2/M y a la inhibición de la proliferación y la migración (Chang et al., 2013; Sakurai et al., 2014; Fang et al., 2014; Ding et al., 2014). Algunos polimorfismos genéticos del gen CCNB1 están relacionados con la predisposición, la progresión y la supervivencia al cáncer de mama en mujeres de la etnia china Han (Li et al., 2013).

CCNB2 codifica la ciclina B2, un miembro de la familia de las ciclinas que interviene en la regulación del ciclo celular (RefSeq, 2002). La CCNB2 aparece regulada al alza en el adenocarcinoma colorrectal (Park et al., 2007). La CCNB2 se sobreexpresa en diversos tumores humanos. La expresión profusa de CCNB2 en las células tumorales está vinculada con un pronóstico negativo en los pacientes con adenocarcinoma de pulmón y carcinoma invasivo de mama (Takashima et al., 2014; Albuлесcu, 2013).

CCT7 codifica la subunidad 7 (eta) del complejo TCP1 portador de chaperonina (CCT), que está implicada en el plegamiento dependiente de ATP de varias proteínas, entre ellas la actina y la tubulina. Se ha descubierto que CCT7 forma parte de una red secundaria de proteínas que es notablemente diferenciadora del cáncer colorrectal humano avanzado (Nibbe et al., 2009).

CDC42BPG (también llamada MRCK gamma) codifica la proteína cinasa asociada a CDC42 gamma (similar a DMPK), un miembro de la familia de las cinasas asociadas a CDC42 relacionada con la cinasa de la distrofia miotónica (Ng et al., 2004).

CDC6 codifica una proteína esencial para iniciar la replicación del ADN (RefSeq, 2002). La expresión de la CDC6 está desregulada en distintos tipos de cáncer, como los de vesícula biliar, cuello uterino y próstata (Wu et al., 2009; Wang et al., 2009c; Robles et al., 2002; Shu et al., 2012). CDC6 coopera con c-Myc para promover la inestabilidad genética, la transformaciónseudotumoral y la atenuación de la apoptosis (Chen et al., 2014a). La ATR inducida por la hipoxia promueve la degradación de la CDC6. El inicio de la replicación del ADN está regulado por la p53 a través de la estabilidad de la proteína Cdc6 (Duursma and Agami, 2005; Martin et al., 2012).

CENPE codifica la proteína centromérica E, de 312 kDa, una proteína motora similar a la cinesina que se acumula en la fase G2 del ciclo celular. CENPE ha sido propuesta como uno de los motores responsables del movimiento de los cromosomas de los mamíferos y/o del alargamiento del huso mitótico (RefSeq, 2002). La expresión de CENPE se correlaciona notablemente con el grado del glioma y podría complementar otros parámetros para predecir el tiempo de supervivencia en los pacientes aquejados de glioma (Bie et al., 2011). CENPE aparece regulada al alza en los tumores epiteliales de ovario quimiorresistentes con respecto a los tumores quimiosensibles (Ju et al., 2009). CENPE está regulada al alza en tumores hipofisarios secretores de prolactina que son invasivos y agresivos (Wierinckx et al., 2007).

CIRH1A (también llamado cirrina) codifica la proteína autosómica recesiva 1A de la cirrosis, una proteína portadora de repetición WD40 radicada en el nucleolo. Causa la cirrosis infantil de los amerindios norteamericanos (NAIC) (RefSeq, 2002). La CIRH1A puede regular al alza un elemento canónico del NF-kappaB y podría intervenir en la regulación de otros genes que contienen elementos de dicho factor. Esto apunta a que la CIRH1A influiría en la vía del NF-kappaB relacionada con el cáncer (Yu et al., 2009).

CNOT1 codifica una importante subunidad enzimática del complejo desadenilasa CCR4-NOT, que es un importante regulador de la traducción y la estabilidad del ARNm (Ito et al., 2011; Boland et al., 2013). Se conocen polimorfismos mononucleotídicos (SNP) del gen CNOT1 en el marco del osteosarcoma y de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Gutiérrez-Camino et al., 2014; Bilbao-Aldaiturriaga et al., 2015). La eliminación de CNOT1 propicia la estabilización de los ARNm y la activación de la apoptosis mediada por el estrés del retículo endoplasmático (Ito et al., 2011).

El gen COL12A1 codifica la cadena alfa del colágeno de tipo XII, perteneciente a la familia de los colágenos FACIT (colágenos asociados a fibrillas con hélices triples interrumpidas), por lo que forma parte de la matriz extracelular (MEC) (RefSeq, 2002). COL12A1 aparece sobreexpresado en variantes de estirpes celulares del cáncer de ovario que son farmacorresistentes (Januchowski et al., 2014). En el cáncer colorrectal, COL12A1 aparece sobreexpresado en el estroma desmoplásico que envuelve a los fibroblastos asociados con el cáncer, así como en las células cancerosas que revisten el frente de invasión (Karagiannis et al., 2012).. CYP2W1 codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450, un conjunto de monooxigenasas que catalizan numerosas reacciones implicadas en el metabolismo de los fármacos así como en la síntesis del colesterol y los esteroides, entre otros lípidos (RefSeq, 2002). La CYP2W1 aparece sobreexpresada en diversos tipos de cáncer humano como el cáncer hepatocelular, colorrectal y gástrico. La sobreexpresión de CYP2W1 está vinculada con la progresión tumoral y la supervivencia negativa (Aung et al., 2006; Gomez et al., 2010; Zhang et al., 2014e). Dada su expresión específica en tumores, la CYP2W1 suscita interés como diana farmacológica o activador enzimático de profármacos destinados contra el cáncer (Karlgren and Ingelman-Sundberg, 2007; Nishida et al., 2010).

ECT2 codifica la proteína transformante de células epiteliales 2, un factor de intercambio del nucleótido guanina y proteína transformante que está relacionada con los factores de intercambio específicos de Rho y con los reguladores del ciclo celular (RefSeq, 2002). La ECT2 se sobreexpresa como resultado de amplificaciones génicas específicas de tumores en diversas neoplasias malignas humanas, como el cáncer de pulmón, ovario,

estómago o páncreas. ECT2 es importante en la proliferación, migración e invasión celulares así como en la oncogenicidad (Fields and Justilien, 2010; Jin et al., 2014). La proteína cinasa C iota y la ECT2 activan a través de la vía de señalización de MEK/ERK un fenotipo celular iniciador de tumor en el cáncer de ovario (Wang et al., 2013e). La ECT2 nuclear se une preferencialmente a la Rho GTPasa Rac1 y propicia, a través de la activación de Rac1, la transformación celular, mientras que la ECT2 citoplasmática se une a la Rho GTPasa RhoA y desencadena a través de la activación de ésta la formación del surco de división durante la citocinesis (Su et al., 2011; Huff et al., 2013).

GPR56 codifica el receptor G1 acoplado a proteína G de adhesión (ADGRG1), que regula la estructuración (*patterning*) de la corteza cerebral. GPR56 se une específicamente a la transglutaminasa 2, un inhibidor de la progresión tumoral (RefSeq, 2002). GPR56 inhibe la oncogenia mediante la supresión del crecimiento tumoral y la metástasis en el melanoma y el cáncer de próstata. El papel en otros tipos de cáncer parece ser complejo, quizás debido a la variada capacidad de las diferentes variantes de corte y empalme de la GPR56 para activar factores de transcripción como los elementos de respuesta de c-myc y p53 (Kim et al., 2010b; Xu et al., 2010; Yang and Xu, 2012). GPR56 inhibe la producción del VEGF en las células del melanoma e impide que contribuyan a la angiogenia y que crezcan a través de la vía de señalización que implica a la proteína cinasa C alfa (Yang et al., 2011a).

HS6ST2 codifica un miembro de la familia del gen de la sulfato de heparina (SH)-sulfotransferasa. HS6ST2 cataliza la transferencia del sulfato al SH (RefSeq, 2002). HS6ST2 se sobreexpresa en distintos tipos de cáncer como el cáncer de tiroides, colorrectal y ovario y está relacionada con la migración, invasión y el pronóstico negativo (Backen et al., 2007; Hatabe et al., 2013; Di et al., 2014). El TGF-beta promueve la metástasis tumoral mediante la estimulación de la producción de HS6ST2 e IL-11 (Pollari et al., 2012). HS6ST2 es un regulador de la angiogenia en respuesta a las vías de señalización de los factores EGF, FGF2 y VEGF (Ferrerias et al., 2012; Cole et al., 2014).

IER3 (también llamado IEX-1) codifica la proteína de respuesta precoz inmediata 3 que actúa como protección de las células contra la apoptosis inducida por Fas o por el factor de necrosis tumoral alfa (RefSeq, 2002). La desregulación de la expresión de IER3 en el cáncer de ovario, páncreas, hemático, mama, colorrectal, linfoma y mieloma está vinculada con un pronóstico peor o mejor según el tipo y el estadio de progresión del tumor, lo que convierte a esta proteína en un valioso biomarcador, solo o combinado con otros genes (Wu et al., 2013). La expresión génica de IER3 desempeña un importante papel en la regulación de la apoptosis y del crecimiento celular, ya sea de forma positiva o negativa. La sobreexpresión de IER3 convierte algunas células en sensibles a la apoptosis y acelera la progresión del ciclo celular, pero reduce la proliferación de otras células, en tanto que la alteración de su expresión está relacionada con una disminución tanto de la apoptosis como de la progresión del ciclo celular (Zhang et al., 2011a). IER3 interfiere con ciertas vías de señalización, en particular con las de NF-kappaB, MAPK/ERK y PI3K/Akt. Modelos en ratón también han revelado la implicación de la expresión de IER3 en funciones inmunitarias (Arlt and Schafer, 2011; Wu, 2003).

ITPR3 codifica un receptor del 1,4,5-trisfosfato de inositol que contiene un canal de calcio en el extremo C-terminal y un sitio de unión a ligando en el N-terminal. ITPR3 interviene en la secreción exocrina vinculada con el metabolismo energético y el crecimiento (RefSeq, 2002). ITPR3 se sobreexpresa en varios tipos de cáncer como el cáncer colorrectal, gástrico y de mama y está directamente relacionado con la progresión tumoral y la malignidad del tumor (Shibao et al., 2010; Mound et al., 2013; Sakakura et al., 2003). Akt puede proteger a las células de un modo dependiente de ITPR3 contra la apoptosis al reducir la liberación de Ca^{2+} por parte del retículo endoplasmático (Marchi et al., 2012).

KCNN4 (también llamado KCa3.1 o hIKCa1) codifica parte de un canal de potasio independiente del voltaje heterotetramérico que es activado por el calcio intracelular. A la activación de este canal le sigue la hiperpolarización de la membrana, que facilita la entrada de calcio (RefSeq, 2002). KCNN4 aparece regulado al alza en varios tipos de cáncer como el de mama, pulmón o próstata y está relacionado con la proliferación

celular y el crecimiento tumoral (Chou et al., 2008; Lallet-Daher et al., 2009; Haren et al., 2010; Bulk et al., 2015). La inhibición de KCNN4 regula los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y promueve la activación de p53 que suprime el crecimiento y la migración de las células y propicia la apoptosis (Liu et al., 2015b).

KIRREL (también llamado NEPH1) codifica un miembro de la familia de la proteína similar a la nefrina, cuyos miembros interaccionan con el dominio citoplasmático de la podocina (RefSeq, 2002).

KLK10 (también llamado NES1) codifica un miembro de la subfamilia de la calicreína de proteasas de serina que intervienen en la carcinogénesis y tienen posibilidades de servir como biomarcadores (RefSeq, 2002). KLK10 aparece regulada al alza en el cáncer de colon, ovario y gástrico pero regulado a la baja en el de mama, pulmón y próstata (Yousef et al., 2005; Feng et al., 2006; Zhang et al., 2010; Li et al., 2001). El silenciamiento epigenético de KLK10 se mantiene mediante la señalización de TGFbeta/Smad mientras que su regulación al alza es promovida por la activación de las vías de señalización de Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt (Paliouras and Diamandis, 2008; Papageorgis et al., 2010).

LIG1 es un gen de reparación del ADN que interviene en las vías de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y por escisión de bases (BER). Algunos polimorfismos mononucleotídicos de LIG1 están relacionados con el riesgo de cáncer de pulmón, cáncer de endometrio y glioma (Doherty et al., 2011; Lee et al., 2008b; Liu et al., 2009).

LSG1 codifica la subunidad grande 60S de la GTPasa 1 de exportación nuclear. La proteína es necesaria para mantener la viabilidad celular y puede radicar en el retículo endoplasmático, el núcleo o el citoplasma (RefSeq, 2002).

LSM14B (también llamado RAP55B) codifica un miembro de la familia con dominio LSM (similar a Sm) que interviene en el metabolismo del ARN, la regulación de la fase G2/M de la mitosis, represión de la traducción, la incorporación en partículas de mRNP, la formación de cuerpos P y la localización en los gránulos de estrés (Marnef et al., 2009; Albrecht and Lengauer, 2004).

MAGED2 codifica el miembro D 2 de la familia del antígeno del melanoma, perteneciente al grupo recién definido de MAGE-D en Xp11.2, un punto caliente del retraso mental ligado al X. MAGED2 se expresa ubicuamente con altos niveles de expresión en regiones específicas del cerebro y en el intersticio testicular. MAGED2 es un posible regulador negativo de la actividad de la p52 natural (Langnaese et al., 2001; Papageorgio et al., 2007). La sobreexpresión de MAGED2 está asociada con el melanoma, el cáncer de mama y el de colon (Li et al., 2004; Strekalova et al., 2015).

MAGEF1 codifica un miembro de la superfamilia del antígeno del melanoma (MAGE) que contiene una repetición de microsatélites y que se expresa ubicuamente, lo cual parece indicar su implicación en la fisiología normal de la célula (Stone et al., 2001). El flavopiridol induce la inhibición de la proliferación de las células tumorales humanas y la regulación a la baja de MAGEF1 en diferentes estirpes de células tumorales humanas (Lu et al., 2004). MAGEF1 aparece sobreexpresada sustancialmente en tejidos de cáncer colorrectal (Chung et al., 2010).

MDH1 codifica la malato deshidrogenasa, enzima que cataliza la oxidación reversible del malato en oxaloacetato mediante el sistema del cofactor NAD/NADH en el ciclo del ácido cítrico. MDH1 está localizada en el citoplasma y podría tener un papel crucial en la lanzadera del malato-aspartato que opera en la coordinación metabólica entre el citosol y las mitocondrias (RefSeq, 2002). En el glioblastoma el MDH1 constituye una diana para varios microARN desregulados y su expresión está reprimida. Junto con oncosupresores u oncogenes conocidos la MDH1 podría ayudar a distinguir entre los gliomas de alto y bajo grado (Lages et al., 2011; Kounelakis et al., 2013). La MDH1 aparece sobreexpresada en los adenomas hipofisarios no secretores y en los oncocitomas tiroideos (Hu et al., 2007; Baris et al., 2004).

MYO10 codifica un miembro de la superfamilia de la miosina que representa una miosina no convencional. Actúa como un motor molecular basado en la actina que interviene en la integración de las partes del citoesqueleto de actina F y de microtúbulos durante la

meiosis (RefSeq, 2002). MYO10 se sobreexpresa en diversas entidades tumorales, como el cáncer de mama y de pulmón y está vinculada con la metástasis, la migración celular y un fenotipo agresivo (Cao et al., 2014; Sun et al., 2015b; Courson and Cheney, 2015). La p53 mutante promueve

NCAPG codifica la subunidad G del complejo I de condensación ajeno al mantenimiento estructural del cromosoma (no SMC), que es la responsable de la condensación y la estabilización de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis (RefSeq, 2002). La NCAPG aparece regulada a la baja en pacientes con mieloma múltiple, la leucemia mieloide aguda y de las células leucémicas de la sangre o en células de mieloma (Cohen et al., 2014). El NCAPG podría actuar como un gen de multirresistencia farmacológica en el cáncer colorrectal (Li et al., 2012). NCAPG aparece intensamente regulado al alza en el subtipo cromóforo del carcinoma de células renales humanas pero no en el carcinoma convencional de ese tipo (Kim et al., 2010a). La regulación al alza de NCAPG está relacionada con la progresión del melanoma (Ryu et al., 2007). NCAPG está relacionado con el melanoma uveal (Van Ginkel et al., 1998). NCAPG muestra una expresión variable en distintas células tumorales (Jager et al., 2000).

NDRG3 codifica un miembro de los genes regulados (*downstream*) por N-myc que se expresa con profusión en el testículo, la próstata y el ovario y que podría intervenir en la espermatogenia (Zhao et al., 2001). NDRG3 podría actuar como gen oncosupresor en distintos tipos de cáncer como el cáncer vesical (Yang et al., 2013; Tsui et al., 2015). NDRG3 actúa como promotor tumoral en el cáncer de próstata, donde su expresión regulada al alza provoca un incremento del ritmo de crecimiento, una mayor migración y la inducción de quimiocinas angiogénicas. La regulación al alza de NDRG3 está asociada con un fenotipo maligno en células de cáncer hepatocelular (Wang et al., 2009b; Fan et al., 2011).

NOL11 codifica la proteína nucleolar 11 que es necesaria para la transcripción óptima del ADNr en la biogenia del ribosoma (Freed et al., 2012; Griffin et al., 2015). Nol11 actúa

como interactuante del gen oncosupresor BRCA1 en el cáncer de mama y de ovario (Hill et al., 2014).

PLAGL2 codifica un miembro de la familia del gen del adenoma pleomórfico (PLAG) y es una proteína con dedo de cinc que reconoce el ADN y/o el ARN (Kas et al., 1998). El PLAGL2 actúa como un protooncogén en diversos tipos de cáncer, como leucemias, gliomas, cáncer colorrectal y adenocarcinomas de pulmón. También existen indicios de que PLAGL2 puede actuar como oncosupresor promoviendo el inicio de la parada del ciclo celular y la apoptosis (Yang et al., 2011b; Hanks and Gauss, 2012; Liu et al., 2014a). PLAGL2 impide la degradación proteosómica de la E3 ubiquitina ligasa Pirh2 que regula la estabilidad de p53. La expresión de PLAGL2 también incrementa el nivel de p73 y regula al alza genes diana de p73 como p21 y Bax (Zheng et al., 2007; Hanks and Gauss, 2012; Landrette et al., 2005).

PTCD2 codifica la proteína 2 con dominio repetido de pentatricopéptido que podría estar implicada en el procesamiento de transcritos de ARN, como el del citocromo b derivado del ADN mitocondrial. La alteración de la función de esta proteína podría intervenir en la etiología de la insuficiencia cardíaca (Xu et al., 2008).

RAD54 codifica una proteína que pertenece a la superfamilia de la helicasa similar a DEAD. Guarda semejanza con las RAD54 y RDH54 de *Saccharomyces cerevisiae*, ambas implicadas en la recombinación homóloga y en la reparación del ADN. Esta proteína se une al ADN bicatenario y muestra actividad ATPasa en presencia de ADN. Este gen se expresa con profusión en el testículo y en el bazo, lo cual apunta a su papel activo en la recombinación mitótica y meiótica (RefSeq, 2002). Se han observado mutaciones homocigotas de RAD54B en el linfoma y en el cáncer de colon primarios (Hiramoto et al., 1999). RAD54B contrarresta los efectos desestabilizadores del genoma causados por la unión directa de RAD51 al ADNdc en células tumorales humanas (Mason et al., 2015).

RNASEH2A codifica un componente de la enzima ribonucleasa H de tipo II heterotrimérica y es la principal fuente de su actividad. RNASEH2A es una endonucleasa de la que se ha predicho que elimina los cebadores de ARN de los fragmentos de Okazaki durante la síntesis de la cadena retrasada del ADN (RefSeq, 2002). RNASEH2A aparece regulada al alza en citoblastos mesenquimáticos transformados y sobreexpresada en numerosas células cancerosas, entre ellas las del cáncer de próstata agresivo. La regulación a la baja de la expresión de RNASEH2A inhibe el crecimiento independiente de la fijación pero no altera la proliferación de las células cancerosas (Flanagan et al., 2009; Williams et al., 2014)

RRM1 codifica la ribonucleótido reductasa M1, una enzima esencial para la producción de los desoxirribonucleótidos antes de la síntesis del ADN en la fase S de las células en división. Es uno de los genes radicados en el dominio de genes sellados de 11p15.5, región importante por contener genes oncosupresores (RefSeq, 2002). RRM1 interviene en la regulación de la proliferación y la migración celular, la oncogenia y el desarrollo de metástasis. Diversos estudios con gran número de pacientes aquejados por distintos tipos de cáncer, como de pulmón, páncreas, mama y estómago han confirmado el valor pronóstico y predictivo de RRM1 (Carvalho et al., 2009; Jordheim et al., 2011; Wang et al., 2013d). El análogo de nucleósido gemcitabina, un antineoplásico habitual en el tratamiento contra el cáncer, tiene como diana a la RRM1 (Jordheim and Dumontet, 2013).

SERPINB5 (también llamado maspina) codifica el miembro 5 del clado B de las serpinas inhibidoras de proteasas, que ha sido caracterizado como un oncosupresor de clase II por su capacidad para promover la apoptosis e inhibir la invasión celular y la angiogenia (Bailey et al., 2006). SERPINB5 es valiosa como marcador molecular para el diagnóstico y como predictor del pronóstico para muchos tipos de cáncer, como los de mama, pulmón, cabeza y cuello, oral y próstata (Marioni et al., 2009; Lonardo et al., 2010; Sager et al., 1996; Sheng, 2004). SERPINB5 actúa como reguladora endógena de la actividad de HDAC1 e interacciona con la vía oncosupresora de p53 (Maass et al., 2000; Kaplun et al., 2012).

SEZ6L2 codifica una proteína relacionada con convulsiones que radica en la superficie celular y que aparece enriquecida en las células beta del páncreas (RefSeq, 2002; Stutzer et al., 2013). La expresión de SEZ6L2 está regulada al alza en el cáncer de pulmón y un nivel de expresión elevado aparece relacionado con una supervivencia más breve (Ishikawa et al., 2006).

SMARCA4 (también llamado BRG1) codifica un miembro de las proteínas portadoras de helicasa y ATPasa de la familia SWI/SNF, que forman parte del gran complejo SWI/SNF remodelador de la cromatina, dependiente de ATP. El complejo es necesario para la activación de la transcripción de los genes que normalmente son reprimidos por la cromatina (RefSeq, 2002). SMARCA4 actúa como oncosupresor y aparece regulado a la baja por mutaciones en diferentes entidades tumorales como son el cáncer de mama, pulmón y colon. Los bajos niveles de SMARCA4 están asociados con la progresión tumoral como la mutación y la invasión (Medina and Sánchez-Céspedes, 2008; Bai et al., 2013b; Reisman et al., 2003; Wang et al., 2016). SMARCA4 está relacionado con varios oncosupresores y con importantes proteínas asociadas a los tumores como p53, p16INK4a, hTERT y Akt (Medina and Sánchez-Céspedes, 2008; Becker et al., 2009; Naidu et al., 2009; Liu et al., 2014b; Wu et al., 2014a).

SMC2 (también llamado CAP-E o SMC2L1) codifica un miembro de la familia de proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas que es crítico para la condensación cromosómica de la mitosis y la reparación del ADN (RefSeq, 2002). El gen SMC2 aparece alterado por una mutación por desplazamiento del marco de lectura y pérdida de expresión en el cáncer gástrico y colorrectal con inestabilidad de microsatélites, lo cual apunta a su posible implicación en la patogénia tumoral (Je et al., 2014). Las alteraciones del gen SMC2 pueden desempeñar un papel en la inestabilidad genómica, que acelera la acumulación de otras alteraciones en los linfomas asociados a piotórax (Ham et al., 2007).

SVIL codifica la supervilina, una proteína bipartita con distintos dominios amino- y carboxi-terminales que parecen servir de ayuda al montaje de la miosina II durante la diseminación celular y el desmontaje de las adhesiones focales (RefSeq, 2002). SVIL aparece notablemente regulada a la baja en el tejido del cáncer de próstata, principalmente a través de la metilación del promotor (Vanaja et al., 2006). SVIL regula la supervivencia celular mediante el control de los niveles de p53. La expresión de SVIL es necesaria para la intercomunicación entre las vías de señalización de la supervivencia y las vías de la motilidad celular (Fang and Luna, 2013).

TMEM222 codifica la proteína transmembrana 222 y está localizado en el cromosoma 1p36.11 (RefSeq, 2002).

ZNF679 codifica una proteína con dedos de cinc que contienen un dominio KRAB (caja asociada a Krüppel) que actúa como factor de transcripción. La región promotora de ZNF679 se une por el correpresor KAP1 y H3me3K9 (trimetilación de la histona 3 de la lisina 9) (O'Geen et al., 2007).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y de destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de

clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

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

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

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

Además, el término «péptido» incluye sales de una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, como por ejemplo, sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato). Se ha de destacar que las sales de los péptidos conformes a

la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en tales condiciones *in vivo*.

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

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

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

Un «epítipo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la

afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos.

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

Tabla 5: Frecuencias de expresión F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y los serotipos más frecuentes del HLA-DR. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori et al., 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$.

Las combinaciones de A*02 o A*24 con determinados alelos HLA-DR podrían ser más o menos abundantes de lo esperado a partir de sus frecuencias aisladas debido al desequilibrio de ligamiento. Para más detalles véase Chanock y cols. (Chanock et al., 2004).

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

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
DR4	Afroamericana (América del Norte)	11,10%
DR5	Afroamericana (América del Norte)	31,10%
DR6	Afroamericana (América del Norte)	33,70%
DR7	Afroamericana (América del Norte)	19,20%
DR8	Afroamericana (América del Norte)	12,10%
DR9	Afroamericana (América del Norte)	5,80%
DR1	Asioamericana (América del Norte)	6,80%
DR2	Asioamericana (América del Norte)	33,80%
DR3	Asioamericana (América del Norte)	9,20%
DR4	Asioamericana (América del Norte)	28,60%
DR5	Asioamericana (América del Norte)	30,00%
DR6	Asioamericana (América del Norte)	25,10%
DR7	Asioamericana (América del Norte)	13,40%
DR8	Asioamericana (América del Norte)	12,70%
DR9	Asioamericana (América del Norte)	18,60%
DR1	Latinoamericana (América del Norte)	15,30%
DR2	Latinoamericana (América del Norte)	21,20%
DR3	Latinoamericana (América del Norte)	15,20%
DR4	Latinoamericana (América del Norte)	36,80%
DR5	Latinoamericana (América del Norte)	20,00%
DR6	Latinoamericana (América del Norte)	31,10%
DR7	Latinoamericana (América del Norte)	20,20%
DR8	Latinoamericana (América del Norte)	18,60%
DR9	Latinoamericana (América del Norte)	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*24	América del Sur	20%
A*24	Europa	18%

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

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

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

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

de ser expresado en una unidad transcripcional recombinante que comprenda elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico.

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

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye tanto el ácido nucleico monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, en lo que concierne por ejemplo al ADN, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia.

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

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

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

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

El término «segmento de ADN» hace referencia a un polímero de ADN, en forma de un fragmento separado o como componente de un constructo de ADN mayor, que deriva de ADN aislado por lo menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, exento de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y de sus secuencias nucleotídicas constituyentes mediante métodos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes corriente abajo (*downstream*) desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

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

El término «aislado» definirá el material que se extrae de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural, si ocurre de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero ese mismo polinucleótido o polipéptido lo estará si es separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Tales polinucleótidos podrán formar parte de un

vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrán formar parte de una composición, y seguir estando aislados en dicho vector o composición puesto que estos no forman parte de su entorno natural.

Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunógenos, descritos de acuerdo con la presente invención también pueden presentarse en forma «purificada». El término «purificado» no implica pureza absoluta; más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan sólo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de inicio o del material natural hasta, al menos, un orden de magnitud; preferiblemente, dos o tres órdenes de magnitud; y, con mayor preferencia, cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

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

animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el “fragmento activo” también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Utilizados en relación con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

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

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

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

- (I) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
- (II) cada hueco (gap) de la secuencia de referencia y
- (III) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y
- (IV) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

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

Tal y como se ha dicho antes, la presente invención se refiere por tanto a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191 o una variante de las mismas que es un 88% homóloga a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191, o una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido. Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o, en el caso de las versiones alargadas de dichos péptidos, a una molécula de la clase II.

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

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

Por «variante» de una secuencia de aminoácidos dada, los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicadas en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de linfocitos T activados.

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía y de las bases de datos científicas, 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 191, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y será capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unión a moléculas MHC de clase I o II. Las variantes de la presente invención conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que

contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín definido en los aspectos de la invención.

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

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

Las sustituciones menos conservadoras pueden implicar el reemplazo de un aminoácido por otro con características similares pero diferenciado de alguna manera en el tamaño, como en el reemplazo de un residuo de isoleucina por alanina. Los reemplazos muy poco o nada conservadores pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por otro polar, o incluso por uno de carácter básico. Estas sustituciones “radicales” no se pueden descartar, sin embargo, como potencialmente inefectivas, ya que los efectos químicos

no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales bien pueden provocar efectos inesperados imposibles de predecir de otra forma a partir de principios químicos simples.

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

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

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

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

Tabla 6: Variantes y motivos de los péptidos acordes con las SEQ ID N.º 7, 9, 31, 192, 212 y 142.

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 7	Y	L	T	R	H	L	A	V	L
									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
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 9	I	L	D	D	H	L	S	R	V

Variantes									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 31	L	L	Y	G	K	Y	V	S	V
									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L

	V							A
	T							
	T							I
	T							L
	T							A
	Q							
	Q							I
	Q							L
	Q							A

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 192	K	I	Q	E	M	Q	H	F	L
	L								V
	L								I
	L								
	L								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
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 212	F	L	L	D	G	S	A	N	V
									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A

		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 142	S	L	V	Q	R	V	E	T	I
Variantes									V
									L
									A
		M							V
		M							
		M							L
		M							A
		A							V
		A							
		A							L
		A							A
		V							V
		V							
		V							L
		V							A
		T							V
		T							
		T							L
		T							A
		Q							V
		Q							
		Q							L
		Q							A

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

Los péptidos de la invención se pueden alargar hasta cuatro aminoácidos, es decir, se pueden añadir 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en cualquier combinación entre 4:0 y 0:4. A continuación en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**Tabla 7 se exponen combinaciones de las elongaciones conformes a la invención:

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

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

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

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

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

En consecuencia, la presente invención también proporciona péptidos y variantes de epítomos de MHC de clase I en los que el péptido o variante tienen una longitud total de

entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 14, esto es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos, que en el caso de los péptidos de unión de clase II también puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 aminoácidos.

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

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

En una forma de realización preferida de la invención el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191.

«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 191 o una variante de las mismas contiene segmentos adicionales de aminoácidos localizados en los extremos N- y/o C-terminal que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un epítipo para el epítipo de moléculas MHC.

No obstante, dichos segmentos pueden ser importantes para facilitar la introducción eficaz del péptido conforme a la presente invención en las células. En una forma de

realización de la presente invención, el péptido es una parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "Ii") tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497. En otras fusiones, los péptidos de la presente invención se pueden fusionar con un anticuerpo tal y como se describe en la presente memoria, o con una parte funcional del mismo, en particular integrándolo en la secuencia del anticuerpo, para que vayan dirigidos específicamente por dicho anticuerpo, o por ejemplo, con un anticuerpo que es específico para las células dendríticas tal y como se describe en la presente memoria.

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

En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos por Meziere y cols. (1997) (Meziere et al., 1997), y que se incorporan en la presente memoria como referencia. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (Meziere et al., 1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. La patente de EE. UU. 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 NaCNBH_3 .

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

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

De manera similar, un péptido o variante de la invención puede ser modificado químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. 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, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido perfórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol,

reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

En resumen, la modificación de p. ej., los residuos arginilo de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilglioxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilglioxal 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 alfa-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.

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

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

Un péptido o variante que está modificado o que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contiene enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados p. ej., utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestra Lukas y cols. (Lukas et al., 1981) y las referencias que aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxycarbonílicos (en el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonílicos (en el de la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por

los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores (*scavengers*) utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo (Bruckdorfer et al., 2004) y las referencias citadas en la misma).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores (*scavengers*) se eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).

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

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

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

Para la identificación y la cuantificación relativa de los ligandos HLA mediante espectrometría de masas se purificaron moléculas HLA de muestras de tejido criogenizadas y se aislaron los péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y se identificaron sus secuencias mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con ionización por nano-electronebulización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de fragmentación de los TUMAP naturales registrados a partir de muestras de cáncer colorrectal (N= 24 muestras positivas para A*02) con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación natural de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de 24 pacientes con cáncer colorrectal.

Las muestras cuya clasificación en subtipos dieron como resultado un subtipo extraño (como A*02:05 o A*02:06) quedaron excluidas de la selección de los péptidos de la presente invención.

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

Además, la plataforma para el descubrimiento de fármacos XPRESIDENT® v2.x permite la cuantificación absoluta directa de niveles de péptidos restringidos a MHC, y preferiblemente restringidos a HLA, en los tejidos cancerosos o en otros tejidos infectados. En resumen, el número total de células se calculó a partir del contenido de ADN total de la muestra de tejido analizada. La cantidad total de péptido de un TUMAP en una muestra de tejido se midió con nanoCL-EM/EM como el cociente entre el TUMAP natural y una cantidad conocida de una versión del TUMAP marcada con isótopos, que constituye el llamado patrón interno. La eficacia del aislamiento de TUMAP se determinó mediante adiciones (*spiking*), a los complejos de péptido:MHC, de todos los TUMAP al lisado del tejido lo antes posible durante el procedimiento de aislamiento de TUMAP y su detección por nanoCL-EM/EM después de finalizar el procedimiento de aislamiento del péptido. El número total de células y la cantidad total de péptido se calcularon a partir de mediciones por triplicado de cada muestra de tejido. Se calcularon las eficacias del aislamiento específicas de péptido como promedio de 10 experimentos de adición, medido cada uno de ellos por triplicado (véanse los ejemplos y la Tabla 22).

Se calcularon los niveles de presentación incluyendo estimaciones de error para cada péptido y cada muestra. Se identificaron los péptidos presentados exclusivamente en

tejido tumoral y los péptidos sobrerepresentados en tejido tumoral respecto a los tejidos y órganos no cancerosos.

Los complejos HLA-péptido de muestras de tejido de cáncer colorrectal se purificaron y los péptidos asociados al HLA se aislaron y se analizaron con cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem (CL-EM) (véanse los ejemplos). Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de cáncer colorrectal primario, que confirman su presentación en el cáncer colorrectal primario.

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

Asimismo, la plataforma para el descubrimiento de fármacos XPRESIDENT® v2.x permite la cuantificación absoluta directa de niveles de péptidos del MHC, preferiblemente restringidos al HLA, en tejidos cancerosos o en otros tejidos infectados. En resumen, el recuento total de células se calculó a partir del contenido total de ADN de la muestra de tejido analizada. La cantidad total de péptido correspondiente a cada TUMAP en una muestra de tejido se midió mediante nanoCL-EM/EM como el cociente del TUMAP natural con una cantidad conocida de una versión radiomarcada del TUMAP, el denominado patrón interno. La eficiencia del aislamiento de TUMAP se determinó mediante el enriquecimiento con complejos de péptido:MHC de todos los TUMAP seleccionados en el lisado tisular en el punto más inicial posible del procedimiento de aislamiento de TUMAP y su detección mediante nanoCL-EM/EM tras la finalización del

procedimiento de aislamiento del péptido. El recuento total de células y la cantidad total de péptido se calcularon a partir de mediciones triplicadas por cada muestra de tejido. La eficiencia en el aislamiento de cada péptido se calculó en forma de media de 10 experimentos de enriquecimiento (*spiking*), cada uno de ellos medido por triplicado (véase el Ejemplo 6 y la Tabla 12).

La presente invención proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente del cáncer colorrectal, que sobrepresentan o presentan exclusivamente los péptidos de la invención. La espectrometría de masas ha revelado que esos péptidos son presentados de forma natural por moléculas HLA en muestras primarias humanas de cáncer colorrectal.

Se ha demostrado que el gen o genes/proteína o proteínas originarios (también denominadas «proteínas enteras» o «proteínas subyacentes») del cual derivan los péptidos aparecen notablemente sobreexpresados en los tejidos cancerosos con respecto a los tejidos normales –en la presente invención «tejidos normales» significa que son células sanas del intestino grueso (colon o recto) o células de otros tejidos normales– lo cual demuestra el alto grado de relación con el tumor de los genes originarios (véase el Ejemplo 2). Asimismo, los propios péptidos aparecen sobrepresentados intensamente en el tejido tumoral - «tejido tumoral» significa en relación con la presente invención una muestra procedente de un paciente aquejado de cáncer colorrectal, pero no de tejidos normales (véase el Ejemplo 1).

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, por ejemplo células de cáncer colorrectal que presenten los péptidos derivados.

Los péptidos de la presente invención han demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están sobrepresentados y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles,

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

La presente descripción se refiere también a receptores de linfocitos T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta («TCR alfa/beta»). Asimismo proporciona péptidos capaces de unirse a TCR y anticuerpos cuando son presentados por una molécula del MHC. La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para expresar los TCR y los péptidos de la presente descripción, así como métodos para el uso de los mismos.

El término «receptor de linfocito 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 que el receptor heterodimérico es capaz de unirse a un antígeno peptídico presentado por una molécula HLA. El término también incluye a los llamados TCR gamma y delta.

En una forma de realización la descripción proporciona un método para producir un TCR como el descrito en la presente memoria, comprendiendo dicho método el cultivo de una

célula hospedadora capaz de expresar el TCR en las condiciones idóneas para promover la expresión de dicho receptor.

La descripción en otro aspecto concierne a métodos acordes con la descripción, en que el antígeno se carga en moléculas MHC de clase I o II que se expresan en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o en una célula presentadora de antígeno artificial mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con una célula presentadora de antígeno o bien el antígeno se carga en tetrámeros MHC de clase I o II mediante la tetramerización de los monómeros del complejo MHC de clase I o II/antígeno.

Las cadenas alfa y beta de los TCR alfa/beta, y las cadenas gamma y delta de los TCR gamma/delta, se consideran en general dotadas de dos “dominios”, esto es, dominios variable y constante. El dominio variable consiste en la concatenación de la región variable (V) con la región de unión (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 (TM) C-terminales que anclan las cadenas alfa y beta a la membrana celular.

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

Los TCR de la presente descripción se unen preferentemente a un complejo de péptido-molécula de 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. Se prefieren más los TCR con alta afinidad dotados de una afinidad de unión de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos. Algunos ejemplos sin ánimo de limitación de intervalos de afinidad de unión preferidos para los TCR de la presente invención son: aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM; aproximadamente 10 nM a aproximadamente 20 nM; aproximadamente 20 nM a aproximadamente 30 nM; aproximadamente 30 nM a aproximadamente 40 nM; aproximadamente 40 nM a aproximadamente 50 nM; aproximadamente 50 nM a aproximadamente 60 nM; aproximadamente 60 nM a aproximadamente 70 nM; aproximadamente 70 nM a aproximadamente 80 nM; aproximadamente 80 nM a aproximadamente 90 nM; y aproximadamente 90 nM a aproximadamente 100 nM.

Tal y como se usa en relación con los TCR de la presente descripción, «unión específica» y las variantes gramaticales de dicho término se emplean para designar un TCR dotado de una afinidad de unión (KD) hacia un complejo de péptido-molécula HLA igual o inferior a 100 μ M.

Los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden incorporar un enlace disulfuro introducido entre sus dominios constantes. Los TCR preferidos de este tipo incluyen aquellos dotados con una secuencia de dominio constante TRAC y con una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, excepto porque la Thr 48 de TRAC y la Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 son sustituidas por residuos de cisteína, y dichas cisteínas forman un enlace disulfuro entre la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR.

Con o sin el susodicho enlace intercatenario introducido, 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

pueden estar enlazadas mediante el enlace disulfuro nativo establecido 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 un marcador detectable seleccionado del grupo consistente en radionúclidos, fluoróforos o biotina. Los TCR de la presente descripción pueden estar conjugados con un principio terapéuticamente activo, como un radionúclido, un agente quimioterapéutico o una toxina.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción portador de al menos una mutación de la cadena alfa y/o de al menos una mutación de la cadena beta presenta una glucosilación modificada en comparación con el TCR no mutado.

En una forma de realización, un TCR que contiene al menos una mutación en su cadena alfa y/o en su cadena beta posee una afinidad de unión y/o una semivida de unión con un complejo de péptido-molécula HLA, que al menos duplica la de un TCR cuya cadena alfa y/o beta no está(n) mutada(s). La potenciación de la afinidad de los TCR específicos de tumor, y su aprovechamiento, depende de la existencia de una franja de afinidades óptimas de tales receptores. La existencia de tal franja se basa en las observaciones de que los TCR específicos para patógenos restringidos a HLA-A2 presentan valores KD que en general son unas 10 veces menores que los TCR específicos para los autoantígenos asociados a tumor restringidos a HLA-A2. Ahora sabemos que a pesar de que los antígenos tumorales tienen el potencial de ser inmunogénicos, puesto que los tumores se originan a partir de las propias células del individuo, solo las proteínas mutadas o las proteínas con un procesamiento traduccional alterado serán detectadas como extrañas por el sistema inmunitario. Los antígenos que están regulados al alza o sobreexpresados (llamados autoantígenos) no inducen necesariamente una respuesta inmunitaria funcional contra el tumor: Los linfocitos T que expresen TCR que sean altamente reactivos contra dichos antígenos serán seleccionados negativamente en el timo en un proceso conocido como tolerancia central, lo que significa que solo pervivirán los linfocitos T cuyos TCR presenten una baja afinidad hacia los autoantígenos. Así pues, la afinidad de los TCR o de las variantes de la presente descripción hacia los péptidos

acordes con la invención puede ser potenciada mediante métodos bien conocidos en la técnica.

La presente descripción se refiere además a un método para identificar y aislar un TCR acorde con la presente descripción, el cual comprende: La incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/péptido; la incubación de los PBMC con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T dotados de gran avidéz mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere además a un método para identificar y aislar un TCR conforme a la presente descripción, el cual comprende: La obtención de un ratón transgénico con los locus enteros del gen TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresen un repertorio diverso de TCR humanos que compense la deficiencia de TCR murinos; la inmunización del ratón con el péptido de interés; la incubación de los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T con gran avidéz mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

En un aspecto, con el fin de obtener los linfocitos que expresan los TCR de la presente descripción, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta de la presente descripción se clonan en vectores de expresión, como retrovirus gamma o lentivirus. Se crean los virus recombinantes y se analiza su funcionalidad, como la especificidad hacia el antígeno y la avidéz funcional. A continuación se toma una alícuota del producto final para transducir a la población destinataria de linfocitos T (generalmente purificada a partir de los PBMC del paciente), que se expande antes de administrarla vía infusión al paciente. En otro aspecto, para obtener linfocitos T que expresen TCR de la presente descripción, los ARN del TCR se sintetizan con técnicas conocidas en la técnica, como por ejemplo, sistemas de transcripción *in vitro*. A continuación los ARN del TCR sintetizados *in vitro* se introducen mediante electroporación en linfocitos T D8+

primarios procedentes de donantes sanos para reexpresar las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta específicas del tumor.

Con el fin de potenciar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden enlazarse funcionalmente con promotores potentes, como repeticiones terminales largas de retrovirus (LTR), citomegalovirus (CMV), virus de citoblastos murino (MSCV) U3, fosfoglicerato cinasa (PGK), β -actina, ubiquitina y un promotor compuesto de virus simiesco 40 (SV40)/CD43, el factor de elongación (EF)-1a y el promotor del virus formador de focos en el bazo (SFFV). En una forma de realización preferida, el promotor es heterólogo con respecto al ácido nucleico que se expresa. Además de promotores potentes, los casetes de expresión del TCR de la presente descripción pueden contener otros elementos adicionales para potenciar la expresión del transgén, como un tracto central polipurínico (cPPT), el cual promueve la traslocación nuclear de los constructos lentivíricos (Follenzi et al., 2000), o el elemento regulador postrancricional del virus de la marmota (wPRE), que aumenta el nivel de expresión del transgén al reforzar la estabilidad del ARN (Zufferey et al., 1999).

Las cadenas alfa y beta de un TCR de la presente invención pueden ser codificadas por ácidos nucleicos insertados en vectores separados, o pueden serlo por polinucleótidos insertados en un mismo vector.

Alcanzar un alto nivel de expresión del TCR en la superficie celular exige que tanto las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido se transcriban en abundancia. Con ese fin, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción se pueden clonar en constructos bicistrónicos en un mismo vector, los cuales han demostrado ser capaces de superar ese obstáculo. La inserción de un sitio de entrada intrarribosómico del virus (IRES) entre las cadenas TCR-alfa y TCR-beta da pie a la expresión coordinada de ambas cadenas, porque ambas son generadas a partir de un único transcrito que se escinde en dos proteínas durante la traducción, asegurando así la producción equimolar de ambas (Schmitt et al. 2009).

Los codones de los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden ser optimizados para potenciar la expresión en la célula hospedadora. La redundancia del código genético permite que algunos aminoácidos sean codificados por más de un codón, pero ciertos codones son menos 'idóneos' que otros por la disponibilidad relativa de los ARNt correspondientes, entre otros factores (Gustafsson et al., 2004). Se ha demostrado que la modificación de las secuencias génicas de la TCR-alfa y la TCR-beta de modo tal que cada aminoácido sea codificado por el codón más idóneo para la expresión génica en mamíferos, así como la supresión de los motivos que provocan inestabilidad en el ARNm o de los sitios de escisión ocultos mejora notablemente la expresión génica de ambas cadenas (Scholten et al., 2006).

Además, el emparejamiento erróneo entre las cadenas de TCR introducidas y las endógenas puede derivar en la adquisición de especificidades que supongan un riesgo significativo para la autoinmunidad. Por ejemplo, la formación de dímeros mixtos de las cadenas del TCR puede reducir el número de moléculas disponibles para formar complejos TCR correctamente aparejados, y por tanto reducir notablemente la avidez funcional de las células que expresan el TCR introducido (Kuball et al., 2007).

A fin de reducir el emparejamiento erróneo se puede modificar el dominio C-terminal de las cadenas introducidas de TCR de la presente descripción para promover la afinidad entre las cadenas, al tiempo que reducir las posibilidades de que las cadenas introducidas se emparejen con los TCR endógenos. Tales estrategias pueden consistir en: La sustitución de los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta humanas con sus contrapartidas murinos (dominio C-terminal murinizado); la creación de un segundo enlace disulfuro entre las cadenas en el dominio C-terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína tanto en las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido (modificación con cisteína); cambiar los residuos que interactúan de los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta ("*knob-in-hole*"); y la fusión directa de los dominios variables de ambas cadenas con el CD3 ζ (fusión con CD3 ζ) (Schmitt et al. 2009).

En una forma de realización, se modifica con técnicas de ingeniería genética una célula hospedadora para que exprese un TCR de la presente descripción. En formas de realización preferidas, la célula hospedadora es un linfocito T humano o una célula progenitora de linfocito T humana. En algunas formas de realización el linfocito T o la célula progenitora de linfocito T se obtienen de un paciente con cáncer. En otras formas de realización el linfocito T o la célula progenitora de linfocito T se obtienen de un donante sano. Las células hospedadoras de la presente descripción pueden ser alogénicas o autólogas con respecto al paciente que va a ser tratado. En una forma de realización, la hospedadora es un linfocito T gamma/delta transformado para expresar un TCR alfa/beta.

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

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo $-NH_2$ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej., ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base

farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

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

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es un agente inmunoterapéutico como una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de forma i.d., i.m, s.c., i.p. e i.v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y (Longenecker et al., 1993)). El péptido también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a los linfocitos T CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de los linfocitos T CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, en el caso de los epítopos de MHC de clase I que estimulan a los linfocitos T CD8 la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítopos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

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

Se han desarrollado diversos métodos para unir polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores, por ejemplo a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, al segmento de ADN se le pueden añadir prolongaciones de homopolímeros complementarios para insertarlo en el vector de ADN. El vector y el segmento de ADN se unen a continuación por medio de puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

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

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

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la invención puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las dadas a conocer en las patentes de EE.UU. N.º 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 y 4.810.648.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención se puede unir con una amplia variedad de secuencias de ADN distintas para introducirlo en un hospedador adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el ADN en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. En general, el vector no consigue transformar todos los hospedadores, lo que

hará necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan quedado transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como por ejemplo de resistencia a antibióticos.

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

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

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

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o el del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (YIp) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores dotados del promotor del CMV (por ejemplo de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable,

expresión en el citoplasma o secreción, y marcador de los extremos N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, c-myc o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, la purificación y el análisis de la proteína recombinante. Las fusiones con doble etiqueta aportan flexibilidad a la detección.

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

En otra forma de realización dos o más péptidos o variantes peptídicas de la invención se codifican y se expresan en orden sucesivo (similar a constructos de «collar de cuentas»). Al hacerlo, los péptidos o 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. Estos constructos también pueden ser utilizados para la terapia contra el cáncer, y podrían inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories

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

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedaroras procariotas, véanse por ejemplo Cohen y cols. (Cohen et al., 1972) y (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman y cols. (Sherman et al., 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, MD 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

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

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

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. (FDA) el 29 de abril de 2010 para tratar el cáncer de próstata hormonorrefractario metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

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

En otra forma de realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante pueden ser preparados para la inyección por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los métodos preferidos para la inyección del

ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter et al., 2012).

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

El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej., respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T CD8-positivos y linfocitos T cooperadores (TH) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2,

MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel[®], micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. ej., MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Allison and Krummel, 1995). También 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 antígeno de los linfocitos T (p. ej., GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. N.º 5.849.589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej., la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas 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 TH1 y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el

adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, y se han obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej., AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafilo, vardenafilo, 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 de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod, resiquimod e interferón-alfa.

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

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

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

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

dominio de unión a antígeno (SDAB), aptámeros, TCR (solubles) y células (modificadas) como linfocitos T alógenos o autólogos. Para evaluar si una molécula es un soporte que se une a una diana, se pueden efectuar ensayos de unión.

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

Cada soporte puede comprender un marcador que permita detectarlo una vez unido mediante la determinación de la presencia o la ausencia de una señal generada por dicho marcador. Por ejemplo, el soporte puede ser marcado con un colorante fluorescente o cualquier otra molécula marcadora celular adecuada. Tales moléculas marcadoras son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo en el caso del marcador por fluorescencia, como el facilitado por un colorante fluorescente, la visualización del aptámero unido se puede lograr mediante microscopía de fluorescencia o de barrido láser o por citometría de flujo.

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

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

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

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

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

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

Los aptámeros resultan útiles para fines diagnósticos y terapéuticos. Además, ha sido posible demostrar que algunos aptámeros son captados por las células tumorales y

pueden actuar, así como vehículos moleculares para la administración dirigida de agentes antineoplásicos como ARNsi en las células tumorales.

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191, conforme con la presente invención con la molécula MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191 o a una variante de las mismas que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191 o a una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de los linfocitos T con dicho péptido en que dicho péptido no es un polipéptido entero subyacente.

La presente invención se refiere además a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191 o a una variante de las mismas que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191, en que dicho péptido o variante tiene una longitud total de 8 a 100, preferiblemente de 8 a 30, y más preferiblemente de 8 a 14 aminoácidos.

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

La presente invención se refiere, además, a los péptidos acordes con la presente invención en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191.

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con

la presente invención para el uso en medicina, en concreto para el tratamiento del cáncer colorrectal.

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

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

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

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

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

La presente invención concierne además al uso acorde con la presente invención, en que dichas células tumorales son células de cáncer colorrectal o células de otro tumor sólido o hematológico como el cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel y cáncer de esófago

La presente invención se refiere, además, a biomarcadores basados en los péptidos acordes con la presente invención, aquí denominados «dianas», que pueden ser utilizados para el diagnóstico del cáncer, preferiblemente del cáncer colorrectal. Además, la presente invención se refiere al uso de estas nuevas dianas para el tratamiento del cáncer.

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

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

Por ejemplo, un ADNc que codifique un péptido acorde con la presente invención, como un péptido acorde con las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191 del polipéptido, o una variante o fragmento de los mismos, se puede expresar en células procariotas (p. ej., bacterias) o eucariotas (p. ej., células de levadura, insecto o mamífero), a partir de las cuales se purificará la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador del cáncer colorrectal utilizado para generar el anticuerpo conforme a la invención.

Una persona versada en la técnica sabrá que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo dotado de la especificidad y la afinidad necesarias para el uso previsto (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, técnicas de imagen *in vivo*, tratamiento con inmunotoxinas). Los anticuerpos son analizados para buscar la actividad deseada con

métodos conocidos, de acuerdo con el fin previsto para los anticuerpos (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para más detalles sobre la generación y el análisis de anticuerpos, véase por ejemplo, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con pruebas ELISA, inmunotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.

El término «anticuerpo monoclonal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población notablemente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posiblemente naturales que pueden estar presentes en pequeño número. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (N.º pat. de EE.UU. 4.816.567, que se incorpora a la presente memoria íntegramente).

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

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567. El ADN que

codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (p. ej., con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

Los métodos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo con técnicas ordinarias conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Ejemplos de la digestión con papaína aparecen descritos en WO 94/29348 y en la Pat. de EE. UU. N.º 4.342.566. La digestión de anticuerpos con papaína normalmente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno dotado de un sitio de unión al antígeno, así como un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento F(ab')₂ y un fragmento pFc'.

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la biolongsitud, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagenia de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagenia dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., de

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

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios residuos de aminoácidos de origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son denominados residuos «importados», que normalmente se extraen del dominio variable «importado». La humanización se puede llevar a cabo básicamente sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567), en los que una parte notablemente más pequeña que un dominio variable humano intacto ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos de

CDR y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

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

Los anticuerpos de la invención se administran preferiblemente a un sujeto incorporándolos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente a la formulación se le añade una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución está situado aproximadamente entre 5 y 8, y más preferiblemente entre 7 y 7,5 aproximadamente. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación prolongada como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, p. ej., películas, liposomas o micropartículas. Para las personas versadas en la técnica será evidente que son preferibles ciertos vehículos dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se va a administrar.

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

ejercer un efecto terapéutico a la par sistémico y local. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

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

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un receptor de linfocito T soluble (sTCR) que reconoce un complejo de péptido-MHC específico. Dichos receptores de linfocitos T solubles se pueden generar a partir de clones de linfocitos T específicos, cuya afinidad se puede incrementar por mutagenia dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). A fin de estabilizar los receptores de linfocito T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar por ejemplo mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por

ejemplo, US 2013/0115191), dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia a un receptor. Se puede encontrar más información en WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. En WO 2012/056407A1 se describe una combinación de sTCR. Otros métodos de producción se revelan en WO 2013/057586A1.

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

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

Los anticuerpos para uso diagnóstico pueden ser marcados con sondas adecuadas para posibilitar la detección con diferentes métodos ópticos. Los métodos para la detección de sondas incluyen, entre otros, microscopía de fluorescencia, óptica, confocal y electrónica; resonancia magnética y espectroscopía; radioscopia, tomografía computadorizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, entre otras, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Los anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La fijación de sondas a los anticuerpos incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda en el anticuerpo, y la unión covalente de un compuesto quelante para unir la sonda, entre otros métodos consabidos en la técnica. Para las técnicas de inmunohistoquímica, la muestra

de tejido patológico puede ser fresca o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante como formol. El corte fijado o incluido que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, de modo que el anticuerpo se emplea para detectar la expresión *in situ* de las proteínas.

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

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

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

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

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

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 191, o una secuencia de aminoácidos variante de las mismas.

Existen otros métodos para generar linfocitos T *in vitro*. Por ejemplo, emplear linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995) utilizan linfocitos de sangre periférica autóloga (PLB) para la preparación de los linfocitos T.

Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter y cols. (Walter et al., 2003) describen la estimulación *in vitro* de linfocitos T con células presentadoras de antígeno (aAPC), que también es una forma adecuada de generar linfocitos T contra el péptido de elección. En la presente invención, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite desencadenar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidez alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad co-estimuladora como anticuerpos anti-CD28. Tales sistemas de aAPC también precisan a menudo el concurso de factores solubles adecuados, por ejemplo citocinas, como la interleucina-12.

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

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

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 191.

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente invención también contempla un equipo que comprende:

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

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

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

descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

El envase que contiene la formulación puede ser un vial multiuso que permita varias administraciones (p. ej., de dos a seis 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-angiogenia, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente. Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden

convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

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

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

Puesto que los péptidos de la invención se aislaron del cáncer colorrectal, el medicamento de la invención se usa preferentemente para tratar ese tipo de cáncer.

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

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

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «archivo» (*warehouse*) designa un grupo de péptidos que han sido preseleccionados por su inmunogenicidad y/o sobrerepresentación en un tipo concreto de tumor. El término «archivo» no implica que los péptidos concretos incluidos en la vacuna hayan sido prefabricados y almacenados en un lugar físico, aunque contempla esa posibilidad. Se contempla expresamente que los péptidos puedan ser fabricados *de novo* para cada vacuna individualizada producida, o que puedan ser prefabricados y guardados. El archivo (p. ej., en forma de una base de datos) está compuesto por péptidos asociados a tumor que se sobreexpresan fuertemente en el tejido tumoral de pacientes cáncer colorrectal que presentan varios alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C. Puede contener péptidos de MHC de clase I y de clase II o péptidos alargados de MHC de clase I. Además de los péptidos asociados a tumor obtenidos de varios tejidos de cáncer colorrectal, el archivo puede contener péptidos marcadores HLA-A*02 y HLA-A*24. Estos péptidos permiten comparar cuantitativamente la magnitud de la inmunidad dependiente de los linfocitos T inducida por los TUMAP y, por consiguiente, extraer importantes conclusiones sobre la capacidad de la vacuna para desencadenar respuestas antitumorales. En segundo lugar, actúan como importantes péptidos de control positivo procedentes de un antígeno exógeno en el supuesto de que no se observe ninguna respuesta de linfocitos T inducida por la vacuna contra los TUMAP derivados de autoantígenos del paciente. Y tercero, a veces permite extraer conclusiones en cuanto al estado de inmunocompetencia del paciente.

Los TUMAP del archivo se identifican por medio de una estrategia que combina la genómica funcional integrada con el análisis de la expresión génica, la espectrometría de masas y la inmunología de linfocitos T (XPresident®). La estrategia asegura que solo los TUMAP realmente presentes en un alto porcentaje de tumores sean escogidos para proseguir el análisis, descartando los que no se expresan o lo hacen muy poco en el

tejido normal. Para la selección inicial de los péptidos, se analizaron de forma escalonada muestras procedentes de pacientes con cáncer colorrectal, así como sangre de donantes sanos.

1. Se identificaron ligandos HLA del material maligno con espectrometría de masas
2. Con un análisis hologenómico de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) se identificaron genes sobreexpresados en el tejido maligno (cáncer colorrectal) con respecto a una gama de órganos y tejidos normales.
3. Los ligandos HLA identificados se compararon con los datos de expresión génica. Los péptidos sobreexpresados o expresados selectivamente por el tejido tumoral, preferiblemente los codificados por genes sobreexpresados o expresados selectivamente como los detectados en el segundo paso se consideraron TUMAP candidatos para la vacuna multipeptídica.
4. Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica para hallar datos adicionales que avalaran la relevancia de los péptidos identificados como TUMAP.
5. La relevancia de la sobreexpresión al nivel del ARNm se confirmó volviendo a detectar en el tejido tumoral los TUMAP seleccionados en el paso 3 y comprobando que no se detectaban (o lo eran muy poco) en los tejidos sanos
6. Para evaluar si era factible que los péptidos seleccionados indujeran respuestas de linfocitos T *in vivo*, se llevaron a cabo pruebas de inmunogenicidad *in vitro* con linfocitos T humanos procedentes de donantes sanos y de pacientes con cáncer colorrectal.

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

Este método es preferido para cánceres raros y pacientes con un perfil de expresión inusual. En contraste con los cócteles multipeptídicos de composición fija que se están desarrollando el archivo permite una concordancia significativamente mayor de la

expresión real de antígenos en el tumor con la vacuna. Se puede usar un péptido o combinaciones de varios péptidos «off-the-shelf» para cada paciente como parte de una estrategia 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 inclusión en la vacuna en función de su idoneidad para cada paciente según un método acorde con la presente invención, tal y como se expone en la presente memoria y a continuación.

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

Preferentemente, los péptidos incluidos en la vacuna se identificarán con el método consistente en: (a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión; (b) comparación de los péptidos identificados con (a) un archivo (base de datos) de péptidos como el descrito antes; y (c) selección de al menos un péptido de la base de datos que presente correlación con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente. Por ejemplo, los TUMAP presentados por la muestra del tumor se identifican mediante: (a1) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal del mismo tipo de tejido de la muestra tumoral para identificar proteínas que se sobreexpresen o se expresen de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Preferentemente, las secuencias de los ligandos MHC se identifican

eluyendo los péptidos unidos de las moléculas MHC aisladas de la muestra tumoral y secuenciando los ligandos eluidos. Preferentemente, la muestra tumoral y el tejido normal se obtienen del mismo paciente.

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

mutaciones somáticas específicas del tumor se determinan comparándolas con las variaciones germinales derivadas de las PBMC y se priorizan. Los péptidos identificados *de novo* pueden ser analizados para determinar su inmunogenicidad según lo descrito antes con el archivo, y los TUMAP candidatos que posean la inmunogenicidad adecuada se escogen para la inclusión en la vacuna.

En una forma de realización indicada a título de ejemplo, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante: (a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión mediante el método antes descrito; (b) comparación de los péptidos identificados en a) el archivo (base de datos) de péptidos que han sido preseleccionados por su inmunogenicidad y su sobrerepresentación en tumores respecto al correspondiente tejido normal; (c) selección de al menos un péptido de la base de datos que presente correlación con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente; y (d) opcionalmente, selección de al menos un péptido identificado *de novo* en el paso (a) para confirmar su inmunogenicidad.

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

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

Cada péptido se disuelve en DMSO antes de formar parte del producto. La concentración de cada solución de péptido se escoge dependiendo del número de péptidos que formarán parte del producto. Cada solución de péptido y DMSO se mezcla en partes iguales para obtener una solución que contenga todos los péptidos del producto con una

concentración de ~2,5 mg/ml por péptido. La solución mezclada se diluye a 1:3 con agua para inyectables hasta alcanzar una concentración de 0,826 mg/ml por péptido en DMSO al 33%. La solución diluida se filtra con un filtro estéril de 0,22 µm. Se obtiene la solución final a granel.

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

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

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

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

Los péptidos de la presente invención pueden ser utilizados para analizar las respuestas de los linfocitos contra ellos, como son las respuestas de los linfocitos T o las respuestas de anticuerpos contra el péptido o el péptido unido a moléculas de MHC. Estas respuestas de los linfocitos pueden ser utilizadas como marcadores pronósticos para decidir los pasos posteriores del tratamiento. Dichas respuestas también pueden ser utilizadas como marcadores indirectos en las estrategias de inmunoterapia destinadas a estimular respuestas linfocitarias a través de diferentes medios, como por ejemplo la vacunación con proteínas, ácidos nucleicos, materiales autólogos, o la transferencia de linfocitos de donantes. En el ámbito de la terapia génica, las respuestas de los linfocitos contra los péptidos pueden tenerse en cuenta para la evaluación de efectos secundarios. El control regular de las respuestas de los linfocitos también puede ser una herramienta valiosa para el seguimiento en trasplantes, por ejemplo con el fin de detectar enfermedades del injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.

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

FIGURAS

Las Figuras 1A a M muestran la sobrerepresentación de varios péptidos en tejidos normales (barras blancas) y de cáncer colorrectal (barras negras). Figura 1A: Símbolo(s) de gen: ZNF679, ZNF716, SAPCD2, Péptido: ALIKQLFEA (SEQ ID N.º: 1); Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 6 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 1 nervio, 1 ovario, 8 esófagos, 2 vesículas biliares, 5 corazones, 16 riñones, 21 hígados, 46 pulmones, 3 ganglios linfáticos, 4 muestras de leucocitos, 3 ovarios, 7 páncreas, 4 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 hipófisis, 2 placentas, 3 pleuras, 1 próstata, 2 glándulas salivales, 4 músculos esqueléticos, 4 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 7 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 3 glándulas

tiroides, 1 tráquea, 1 uréter, 3 vejigas urinarias, 2 úteros, 2 venas, 13 colones, 6 rectos y 24 cánceres colorrectales. El péptido ha sido detectado además en 9/99 cánceres de pulmón, 2/28 cánceres de cerebro, 4/20 cánceres de ovario, 1/45 cánceres de estómago, 1/33 cánceres de próstata y 2/15 cánceres de esófago (no mostrados). Figura 1B: Símbolo(s) de gen: BRCA2, Péptido: KQFEGTVEI (SEQ ID N.º: 138); Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 6 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 1 nervio, 1 ovario, 8 esófagos, 2 vesículas biliares, 5 corazones, 16 riñones, 21 hígados, 46 pulmones, 3 ganglios linfáticos, 4 muestras de leucocitos, 3 ovarios, 7 páncreas, 4 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 hipófisis, 2 placentas, 3 pleuras, 1 próstata, 2 glándulas salivales, 4 músculos esqueléticos, 4 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 7 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 1 tráquea, 1 uréter, 3 vejigas urinarias, 2 úteros, 2 venas, 13 colones, 6 rectos y 24 cánceres colorrectales. El péptido ha sido detectado además en 1/15 cánceres de esófago, 1/28 cánceres de cerebro, 1/45 cánceres de estómago y 3/91 cánceres de pulmón (no mostrados). Figura 1C: Símbolo(s) de gen: IL8, Péptido: KLAVALLAA (SEQ ID N.º: 210); Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 6 arterias, 3 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 1 nervio, 1 ovario, 8 esófagos, 2 vesículas biliares, 5 corazones, 16 riñones, 21 hígados, 46 pulmones, 3 ganglios linfáticos, 4 muestras de leucocitos, 3 ovarios, 7 páncreas, 4 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 hipófisis, 2 placentas, 3 pleuras, 1 próstata, 2 glándulas salivales, 4 músculos esqueléticos, 4 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 7 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 1 tráquea, 1 uréter, 3 vejigas urinarias, 2 úteros, 2 venas, 13 colones, 6 rectos y 24 cánceres colorrectales. El péptido ha sido detectado además en 14/99 cánceres de pulmón, 1/18 cánceres de riñón, 2/28 cánceres de cerebro, 2/16 cánceres de hígado, 1/20 cánceres de ovario, 1/45 cánceres de estómago y 3/15 cánceres de esófago (no mostrados). Figura 1D) Símbolo(s) de gen: TMEM222, Péptido: LLYGKYVSV (SEQ ID N.º: 31); Tejidos de izquierda a derecha: 3 estirpes de células pancreáticas, 3 estirpes de células cutáneas, 1 estirpe de leucocitos, 0 tejidos normales, 28 tejidos de cáncer (2 cánceres de cerebro, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 1 cáncer de esófago, 2 cánceres de riñón, 1 leucemia, 5 cánceres de hígado, 7 cánceres de pulmón, 5 cánceres de ovario, 1 cáncer de próstata y 2 cánceres de recto).

El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Las discrepancias relativas a la lista de tipos de tumores entre la figura 1D y la tabla 4 pueden obedecer al mayor rigor de los criterios de selección aplicados en esta última (para más detalles véase la tabla 4). La Figura 1D expone todas las muestras con presentación detectable del péptido Y, con independencia de los parámetros de sobrerepresentación y del control de calidad técnico de las muestras. Figura 1E: Símbolo(s) de gen: ZNF679, ZNF716, SAPCD2, Péptido: ALIKQLFEA (SEQ ID N.º: 1); Tejidos de izquierda a derecha: 7 estirpes de células cancerosas, 1 cultivo de células cancerosas primarias, 58 tejidos cancerosos (5 cánceres de cerebro, 1 cáncer de mama, 9 cánceres de colon, 1 cáncer colorrectal, 3 cánceres de esófago, 1 cáncer de vesícula biliar, 2 leucemias leucocíticas, 15 cánceres de pulmón, 2 cánceres de ganglio linfático, 1 cáncer de células mieloides, 5 cánceres de ovario, 1 cáncer de próstata, 4 cánceres de recto, 1 cáncer de piel, 2 cánceres de estómago, 2 cánceres de vejiga urinaria y 3 cánceres de útero). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Figura 1F: F) Símbolo(s) de gen: PLAGL2, Péptido: FLAELPGSLSL (SEQ ID N.º: 6); Tejidos de izquierda a derecha: 8 estirpes de células cancerosas, 1 cultivo de células cancerosas primarias, 2 tejidos normales (1 ganglio linfático, 1 bazo), 57 tejidos cancerosos (1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de ciego, 5 cánceres de colon, 2 cánceres de esófago, 1 cánceres de vesícula biliar, 3 leucemias leucocíticas, 2 cánceres de hígado, 13 cánceres de pulmón, 8 cánceres de ganglio linfático, 1 cáncer de células mieloides, 9 cánceres de ovario, 2 cánceres de recto, 1 cáncer de piel, 1 cáncer de estómago, 4 cánceres de vejiga urinaria y 2 cánceres de útero). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Figura 1G: Símbolo(s) de gen: CYP2W1, Péptido: FLDANGHFV (SEQ ID N.º: 23); Tejidos de izquierda a derecha: 1 cultivo de células cancerosas primarias, 3 tejidos normales (3 placentas), 12 tejidos cancerosos (5 cánceres de colon, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de vesícula biliar, 2 cánceres de recto y 3 cánceres de estómago). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Figura 1H: Símbolo(s) de gen: CYP2W1, Péptido: GLIDEVMVL (SEQ ID N.º: 22); Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido normal (1 estómago), 6 tejidos cancerosos (3 cánceres de colon, 1 cáncer de vesícula biliar y 2 cánceres de recto). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Figura 1I: Símbolo(s) de gen: AXIN2, Péptido: ILDDHLSRV

(SEQ ID N.º: 9); Tejidos de izquierda a derecha: 5 tejidos cancerosos (1 cáncer de ciego, 1 cáncer de colon, 1 cáncer de pulmón y 2 cánceres de recto). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Figura 1J: Símbolo(s) de gen: RAD54B, Péptido: KLLAVIHEL (SEQ ID N.º: 152); Tejidos de izquierda a derecha: 3 estirpes celulares, 2 tejidos normales (1 ganglio linfático y 1 bazo), 34 tejidos cancerosos (1 cáncer de mama, 7 cánceres de colon, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de riñón, 8 cánceres de pulmón, 4 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de células mieloides, 4 cánceres de ovario, 1 cáncer de páncreas, 1 cáncer de recto, 3 cánceres de piel y 1 cáncer de vejiga urinaria). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Figura 1K: Símbolo(s) de gen: ECT2, Péptido: SLVQRVETI (SEQ ID N.º: 142); Tejidos de izquierda a derecha: 5 estirpes celulares, 1 cultivo primario, 47 tejidos cancerosos (2 cánceres de vía biliar, 2 cánceres de mama, 1 cáncer de ciego, 7 cánceres de colon, 3 cánceres de esófago, 3 cánceres de vesícula biliar, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres de hígado, 10 cánceres de pulmón, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 4 cánceres de ovario, 1 cáncer de páncreas, 2 cánceres de recto, 2 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago, 2 cánceres de vejiga urinaria y 2 cánceres de útero). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Figura 1L: Símbolo(s) de gen: MMP12, Péptido: KIQEMQHFL (SEQ ID N.º: 192); Tejidos de izquierda a derecha: 1 cultivo primario, 44 tejidos cancerosos (5 cánceres de colon, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de cabeza y cuello, 30 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ganglios linfáticos, 1 cáncer de recto, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de testículo, 1 cáncer de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C. Figura 1M: Símbolo(s) de gen: COL6A3, Péptido: FLLDGSANV (SEQ ID N.º: 212); Tejidos de izquierda a derecha: 3 estirpes celulares, 2 tejidos normales (1 placenta y 1 bazo), 146 tejidos cancerosos (4 cánceres de vía biliar, 13 cánceres de mama, 1 cáncer de ciego, 8 cánceres de colon, 1 cáncer colorrectal, 6 cánceres de esófago, 5 cánceres de vesícula biliar, 5 cánceres de cabeza y cuello, 2 cánceres de riñón, 1 cáncer de hígado, 62 cánceres de pulmón, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 9 cánceres de ovario, 7 cánceres de páncreas, 3 cánceres de recto, 4 cánceres de piel, 5 cánceres de estómago, 5 cánceres de vejiga urinaria y 3 cánceres de útero). El panel de tejidos normales fue el mismo que el de la Figura 1A-C.

La Figura 1A a C muestran perfiles de expresión a modo de ejemplo (expresión relativa comparada con el colon y el recto normales) de genes originarios de la presente invención que están fuertemente sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el cáncer colorrectal en comparación con un grupo de tejidos normales (barras blancas) y en 10 muestras de cáncer colorrectal (barras negras). Tejidos de izquierda a derecha: Glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (entero), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena 3 muestras de colon normal y 10 muestras de cáncer colorrectal. Figura 2A, CCNB1; Figura 2B, CDK1; Figura 2C, CHMP5. La Figura 2D muestra a título de ejemplo perfiles de expresión (expresión relativa comparada con el colon y el recto normales) de genes originarios de la presente invención que se sobreexpresan con profusión o se expresan exclusivamente en el cáncer colorrectal en un panel de tejidos normales (barras blancas) y 20 muestras de cáncer colorrectal (barras negras). Tejidos de izquierda a derecha: 6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebros, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartílago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 2 glándulas salivales, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 hipófisis, 1 recto, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 glándula tiroides, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículo, 1 timo, 1 útero y 20 muestras de cáncer colorrectal. Figura 2D: ECT2.

La Figura 2 muestra datos de inmunogenicidad a título de ejemplo: resultados de la citometría de flujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido.

Las Figuras 4A a C muestran resultados a título de ejemplo respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-A*02⁺ en condiciones *in vitro*. Los linfocitos T CD8⁺ fueron estimulados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-A*02 formando un complejo con el péptido de SEQ ID N.º 22 (A, recuadro izquierdo), el péptido de SEQ ID N.º 9 (B, recuadro izquierdo) o el

péptido de SEQ ID. N.º 142 (C, recuadro izquierdo), respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D con multímeros con A*02/SEQ ID N.º 22(A), A*02/SEQ. ID N.º 9 (B) o A*02/SEQ ID N.º 142 (C). Los recuadros de la derecha (A, B y C) muestra la tinción de control de células estimuladas con complejos A*02/péptido irrelevantes. Los linfocitos CD8+ se seleccionaron entre las células en singlete viables. La aplicación de operadores booleanos ayudó a excluir los falsos positivos detectados con los multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de los pacientes procedían del Hospital Universitario de Tubinga.

Los tejidos normales se obtuvieron de Asterand, Detroit, EE.UU. y Royston, Herts, Reino Unido; Bio-Options Inc, California, EE.UU.; BioServe, Beltsville, Maryland, EE.UU.; Capital BioScience Inc, Rockville, Maryland, EE.UU.; Geneticist Inc., Glendale, California, EE.UU.; Tissue Solutions Ltd, Glasgow, Escocia, RU; Hospital Universitario de Ginebra; Hospital Universitario de Heidelberg; Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto (KPUM); Hospital Universitario de Múnich; ProteoGenex Inc., Culver City, California, EE.UU.; Hospital Universitario de Tubinga.

Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica o la autopsia. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extirpación y permanecieron a -70°C hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

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

Análisis por espectrometría de masas

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

La cuantificación relativa de la CL-EM sin marcador se efectuó por recuento iónico, es decir por extracción y análisis de las características de CL-EM (Mueller et al., 2007). El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas

con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron además con deconvolución del estado de carga y alineamiento del tiempo de retención (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Por último, todas las características CL-EM se cotejaron con los resultados de la identificación de secuencias para combinar los datos cuantitativos de muestras y tejidos diferentes con los perfiles de presentación de péptidos. Los datos cuantitativos se normalizaron en proporción dos tercios de acuerdo con la tendencia central para tener en cuenta la variación entre los duplicados técnicos y biológicos. De ese modo, cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo, todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra así como las variaciones de los duplicados. Los perfiles superponen muestras de cáncer colorrectal con muestras de tejido normal de referencia.

La Figura 1 muestra perfiles de presentación de péptidos sobrerepresentados y mostrados aquí a título de ejemplo.

Las puntuaciones de presentación de péptidos mostrados a título de ejemplo se exponen en la Tabla 8.

Tabla 8: Puntuaciones de presentación. La tabla enumera péptidos sobrerepresentados muchísimo más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+++), sobrerepresentados mucho más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (++), o sobrerepresentados más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+).

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación del péptido
1	ALIKQLFEA	+++
2	ALLPRYFFL	+++
3	RLIPDTLYSV	+++
4	RLAELTVDEFL	+++

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación del péptido
5	WLFDDGGLTL	+++
6	FLAELPGSLSL	+
7	YLTRHLAVL	+++
8	ALMLQGVDLL	+++
9	ILDDHLSRV	+++
10	RMYNKIFAI	+++
11	YLFEKTFNM	+++
12	ALVQGILERV	+++
13	FLLAEDTKV	+++
15	LQLDKEFQL	+
16	VLVDQSWVL	+++
17	ALAAARVEL	+++
18	FLSSLKGGLL	+++
19	RLYTKLLNEA	+++
21	VLIDHRWVL	+++
22	GLIDEVMVL	+++
23	FLDANGHFV	+
25	SLADRLIGV	+++
26	GLASKENFSNVSL	+++
27	LLADEDSSYL	+++
30	GLSSAYGGL	+++
31	LLYGKYVSV	+++
32	KLNTETFGV	+++
33	ALWEKNTHL	+++
34	ILLEKSVSV	+++
35	KLLDLTVRI	+++
36	GLLESPSIFNFTA	+++
37	GLFAGLGGAGA	+++
38	SLAPTPVSA	+++
39	GLNGGSPAAA	+++
40	ALSNVIHKV	+++
41	ILDDSFKLL	++
42	SILDDSFKL	+++
43	TLDAAQPRV	++
44	SLESKLTSV	+++
45	ALAELLHGA	+++
46	GLDDRYSLV	+
47	KLYERCEVV	++
48	FLDASDPAL	+++
51	QVWEIQHTV	++

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación del péptido
53	FLLGSEIKL	++
54	ALLNGEYLLAA	+
56	VLFTDEGVPKFL	+
57	NLLEKENYL	++
58	AMADKMDMSL	+
59	LLTDNVVKL	+
60	VLDEDEPRFL	+
61	KLLKLFQGV	+++
62	YLAPENGYL	++
63	KLFSILSTV	+
64	KTLGKLWRL	+++
65	FGAPGIISA	+++
66	GLDDGPDFL	+
67	SLNDLEKDVMLL	+
68	SILQFVHMOV	++
69	GMLNEAEGKAIKL	+
70	MISELEVRL	+
71	RLWTEIPTAI	++
72	YLLDYPNNLL	++
73	YLFDAVSM	++
74	YLMGFLHAV	++
75	EMIENIQSV	+
77	SLLKRDFGA	+
78	ALDPELLLL	+
80	QVDEVVDIMRV	++
81	ALLSQQTHL	++
82	QLYEEDTKL	++
83	LTIEDGIFEV	+
88	KLDIKVETV	+
89	SLIEYEFV	++
90	GLLKPGLNVVL	+
92	WIDDTSAFV	+++
93	SLQELRLLL	+
95	AILDAHIEV	+
96	KLYSRLVYV	++
97	ALWWGVVTV	++
100	SLDDFLATA	+
102	KILVSLIEV	+++
103	FLFGYPKRL	+
110	LLGELPRLLLL	+

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación del péptido
111	HMDDGGYSM	+
112	KLGGVLIYL	+++
113	ILYDLQQNL	+
123	KTLEERSYLL	+++
124	RVLPPSALQSV	++
125	KLGDFGLLVEL	+++
126	TLAKYLMEL	+++
127	RLAELTVDEFLA	+++
128	MLDDRAYLV	++
129	VLIDVLKEL	+++
130	GLGGSQQLIDTHL	+++
131	KLLDVVHPA	+++
132	ALLNAILHSA	+++
133	RTFEKIEEV	+++
134	GVAGGSILKGV	+++
135	KLQEEIPVL	+++
136	KLFDIFSQQV	+++
137	QLTEIKPLL	+++
138	KQFEGTVEI	+++
139	VLLNEILEQV	+
141	AVIEHLERL	+++
142	SLVQRVETI	+++
143	KLSDVWKEL	+++
144	LLNDRIWLA	+
145	LLLEVVKQV	+++
146	ALSDETWGL	+
148	RLLNMTEVV	++
150	RLADLEALKV	+++
152	KLLAVIHEL	+
153	ILFSEDSTKLFV	+
154	KLPSETIFVGC	+
155	RLLGEEVVRV	++
156	SLMMTIINL	++
157	SLIERDLKL	++
158	GLLDPSVFHV	+++
159	VLVDDDGIKVV	+++
160	KLLEFDQLQL	++
161	FLKNELDNV	++
162	KLMDYIDEL	++
163	RLLHEVQEL	++

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación del péptido
164	KMLDEILLQL	++
165	RLLDFPEAMVL	+++
166	GLLEARGILGL	+
168	GLIRFPLMTI	++
170	ALAGGITMV	++
171	RLQETEGMVAV	+
172	LLDVTVMQV	+
173	KLGDLMVLL	+
177	ALLQGAIESV	+
178	YLFREPATI	+
179	RLLJPLSSA	+
180	NLLEIAPHL	++
183	TLQEVVTGV	+
185	VLYTGVRV	+
186	KMSEKILL	+
187	GLHNVVYGI	++
188	FLVDGPRVQL	+
192	KIQEMQHFL	+++
193	KLSPTVVGL	+++
194	SLYKGLLSV	+++
195	LLGERVAL	+++
198	VLYGPDVPTI	++
199	FLLEREQLL	+++
201	GJFNGALAAV	+++
202	GLAALAVHL	+++
203	KLIDLSQVMYL	+
204	KLLDLETERILL	++
205	RLHDENILL	+++
206	RIAGIRGIQGV	++
207	KLCEGFNEV	+++
208	RLIDRIKTV	+++
209	KLQDGLLHI	+++
210	KLAVALLAA	+++
211	SLFGKKYIL	+++
213	LLWAPTAQA	+++
214	SVLEKEIYSI	+++
215	KLQEKIQEL	+++
216	YLWDLHDHGFAGV	+++
217	KLLDTMVDFTL	++
218	KLSWDLIYL	+

SEQ ID No.	Secuencia	Presentación del péptido
220	KMDPVAYRV	+
221	ILNVDGLIGV	+
223	VLMQDSRLYL	+++
224	QLQEGKNVIGL	+++
225	YLYGQTTTYL	+
226	FLVDGSWSV	+
227	LTAPPEALLMV	++
228	SMSGYDQVL	+
229	YLLEKFVAV	++
230	AMSSKFFLV	++
231	RLFADILNDV	+++
232	RLLDSVSRL	+
233	RLDDLKMTV	++
234	KMFESFIESV	++
235	LLHEENFSV	++
236	KMSELQTYV	+
237	KLVEFDLGA	++
238	NMLEAVHTI	++
239	QLIEKNWLL	+++
240	VLAPRVLRA	++
241	ILIDWLQV	+
242	RLEEDDGDVAM	++
243	TLMDMRLSQV	+
244	SLHFLILYV	+
245	QLIDYERQL	+
246	GLTDNIHLV	+
247	SLDTLMTYV	+
249	ALYGRLEV	+
250	ALCEENMRGV	+
252	YVYQNNIYL	+
254	VLFQEALWHV	++
257	SLADFMQEV	++
259	ALADKELLPSV	+
261	YLYDSETKNA	+

EJEMPLO 2

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

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

Fuentes de ARN y preparación

Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por diversas instituciones (véase el Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras con TRI Reagent (Ambion, Darmstadt, Alemania) y después se purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Ámsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, California, EE.UU.). El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Experimentos con micromatrices

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Todos los

pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva 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. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios de la presente invención que aparecen muy sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el cáncer colorrectal. La Tabla 9 muestra las puntuaciones de expresión de otros genes mostrados a título de ejemplo.

Tabla 9: Puntuaciones de expresión. La tabla enumera péptidos derivados de genes que se sobreexpresan muchísimo más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+++), se sobreexpresan mucho más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (++), y se sobreexpresan más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+).

SEQ ID N.º	Nombre del gen	Secuencia	Expresión del gen
2	ATP10B	ALLPRYFFL	+++
5	SLC12A1,SLC12A2,SLC12A3	WLFDGGLTL	+++
6	PLAGL2	FLAELPGSLSL	+++
7	MUC2	YLTRHLAVL	+
8	HSPD1	ALMLQGVDLL	+
13	SMC2	FLLAEDTKV	+++

SEQ ID N.º	Nombre del gen	Secuencia	Expresión del gen
16	KLK10	VLVDQSWVL	+
17	SLC12A2	ALAAARVEL	+++
19	MYO10	RLYTKLLNEA	+++
27	CHMP5	LLADEDSSYL	++
29	AP3D1	QMLDVAIRV	+
35	OLFM4	KLLDLTVRI	+
36	LARP4B	GLLESPSIFNFTA	+
39	CDX2	GLNGGSPAAA	++
40	SERPINB5	ALSNVIHKV	+
41	HEPH	ILDDSFKLL	++
42	HEPH	SILDDSFKL	++
46	PKP3	GLDDRYSLV	+
47	ERBB3	KLYERCEVV	+
53	TBC1D8B	FLLGSEIKL	+
55	PMS1	QIITSVVSV	++
57	PKP2	NLLEKENYL	++
60	AGTPBP1	VLDEDEPRFL	+
63	HEATR2	KLFSILSTV	++
64	SOX8,SOX9,SOX10	KTLGKLWRL	++
67	SMARCA4	SLNDLEKDVMLL	++
68	PTPRO	SILQFVH MV	+
73	APIP	YLFDAVSM	+
74	ARHGAP8,PRR5- ARHGAP8,PRR5	YLMGFLHAV	+
75	CFTR	EMIENIQSV	+++
77	DDX5	SLLKRDFGA	+
79	SRSF11	SLAADQLLKL	++
81	TGIF1	ALLSQQTHL	+
84	DSP	SMVEDITGLRL	+
86	MUC13	KVFPGKISV	+++
89	ITGA6	SLIEYEF RV	++
90	EBNA1BP2	GLLKPGLNVVL	++
92	PARN	WIDDTSAFV	+
98	ATP13A3	AMNGKSFSV	+++
104	MUC2	ILLTIKDDTIYL	+
112	GALNT7	KLGGVLIYL	++
113	KCNN4	ILYDLQQNL	+
123	RRM1	KTLEERSYLL	+++
124	AURKB	RVLPPSALQSV	++

SEQ ID N.º	Nombre del gen	Secuencia	Expresión del gen
126	CCNB1,CCNB2	TLAKYLMEL	+++
129	CNOT1	VLIDVLKEL	+
130	PRRC2C	GLGGSQIDTHL	++
132	NOL11	ALLNAILHSA	++
134	EIF2S3,LOC255308	GVAGGSILKGV	+
135	CENPE	KLQEEIPVL	+
138	BRCA2	KQFEGTVEI	++
139	NCAPG	VLLNEILEQV	+++
140	NCAPG	LLNEILEQV	+++
142	ECT2	SLVQRVETI	++
144	ZSWIM1	LLNDRIWLA	++
147	KDM5C	TLTELRAFL	+
148	PDXDC1	RLLNMTEVV	+
152	RAD54B	KLLAVIHEL	+
156	TOP2A	SLMMTIINL	+++
157	URB1	SLIERDLKL	+
160	SYNJ2	KLLEFDQLQL	+
161	TRAIP	FLKNELDNV	+
166	CDC6	GLLEARGILGL	+
171	HMGXB4	RLQETEGMVAV	+
172	COPG1	LLLDTVTMQV	+
180	GPD2	NLLEIAPHL	+
183	AGK	TLQEVVTGV	++
184	PRKDC	SLLDENNVSSYL	+
187	CNOT1	GLHNVVYGI	+
188	ZSWIM1	FLVDGPRVQL	++
190	NCAPD2	AMAEMVLQV	+
191	CDK5RAP2	QLFSEIHNL	+
192	MMP12	KIQEMQHFL	++
194	RAD54B	SLYKGLLSV	+
197	ZNF451	SLFGQDVKAV	+
198	CEACAM6	VLYGPDVPTI	++
202	FANCA	GLAALAVHL	++
204	GOLGA4	KLLDLETERILL	+
205	RPGRIP1L	RLHDENILL	+
206	EFR3A	RIAGIRGIQGV	+
208	NAA35	RLIDRIKTV	+
215	CENPE	KLQEKIQL	+
219	MUC2	FLDEKGRCV	+

SEQ ID N.º	Nombre del gen	Secuencia	Expresión del gen
223	CDK1	VLMQDSRLYL	+++
225	TOP2A	YLYGQTTTYL	+++
228	HNRNPH1,HNRNPH2	SMSGYDQVL	+++
229	DDX11,DDX12P,LOC642846	YLLEKFVAV	+
230	WNT5A	AMSSKFFLV	+
232	LAMC2	RLLDSVSRL	++
233	LAMC2	RLDDLKMTV	++
235	TCF20	LLHEENFSV	+
236	CENPF	KMSELQTYV	++
239	KIF15	QLIEKNWLL	+++
240	RCN1	VLAPRVLRA	++
241	CCNB1	ILIDWLVQV	+++
250	EEF2	ALCEENMRGV	+
257	CNOT1	SLADFMQEV	+

EJEMPLO 3

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

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

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para realizar las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígenos artificiales cargadas con el complejo péptido-MHC (pMHC) y el anticuerpo anti-CD28, los inventores aislaron primero los linfocitos T CD8+ de productos de leucoféresis frescos HLA-A*02 mediante la selección positiva con microperlas con CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) procedentes de donantes sanos obtenidas de la Clínica Universitaria de Mannheim, Alemania, tras obtener el consentimiento informado.

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

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

El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humano (Jung et al., 1987) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,6 µm de diámetro recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE.UU.).

Los pMHC usados en las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV (SEQ ID N.º 266) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID N.º 267), respectivamente.

Placas de 96 pocillos se tapizaron con 800.000 microperlas / 200 µl en presencia de 4 x 12,5 ng de diferentes pMHC biotinilados, se lavaron y después se les añadió 600 ng de anti-CD28 biotinilado en un volumen de 200 µl. Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1x10⁶ linfocitos T CD8⁺ con 2x10⁵ microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Para la lectura de los multímeros pMHC

con 8 moléculas pMHC distintas por condición se empleó una estrategia de codificación combinatoria bidimensional según lo descrito en otro lugar (Andersen et al., 2012), con pequeñas modificaciones que comprenden el acoplamiento con 5 fluorocromos distintos. Por último, los análisis de los multímeros se llevaron a cabo tiñendo las células con el colorante vital Live/dead® del IR cercano (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con anticuerpo anti-CD8-FITC clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) y multímeros pMHC fluorescentes. Para el análisis se equipó un citómetro BD LSRII SORP con los filtros y láseres adecuados. Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis multimérico se efectuó con el software FlowJo (Tree Star, Oregón, EE. UU.). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ multímero+ específicos se detectó comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de multímero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos del cáncer colorrectal

En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En la Figura 3 se muestran a título de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de 1 péptido de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 2 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 10A.

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

Resultados a título de ejemplo de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante de los péptidos de la invención.

<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

Seq ID	Secuencia	Pocillos	Donantes
219	MUC2-001	++	+++
220	QAR-001	+++	++++

Tabla 10B: Datos adicionales de la inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I de la invención.

Resultados a título de ejemplo de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante de los péptidos restringidos a HLA-A*02 de la invención. Se indican los resultados de los experimentos de inmunogenicidad en condiciones *in vitro*. Se resume el porcentaje de pocillos y de donantes positivos (entre los evaluables), indicados del modo siguiente: <20% = +; 20% a 49% = ++; 50% a 69% = +++; >= 70% = ++++.

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]
1	ALIKQLFEA	"+"
2	ALLPRYFFL	"++++"
3	RLIPDTLYSV	"++++"
5	WLFDDGGLTL	"++"
7	YLTRHLAVL	"+"
9	ILDDHLSRV	"+"
10	RMYNKIFAI	"++++"
11	YLFKETFNM	"+"
12	ALVQGILERV	"++++"
13	FLLAEDTKV	"++"
17	ALAAARVEL	"++"
18	FLSSLKGGLL	"+"
19	RLYTKLLNEA	"++++"
21	VLIDHRWVL	"+"
22	GLIDEVMVL	"++"
31	LLYGKYVSV	"++"
32	KLNTETFGV	"++"
37	GLFAGLGGAGA	"+"
38	SLAPTPVSA	"+"
42	SILDDSFKL	"+"
47	KLYERCEVV	"+"
59	LLTDNVVKL	"+"
64	KTLGKLWRL	"++++"
123	KTLEERSYLL	"+"

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]
124	RVLPPSALQSV	"+"
127	RLAELTVDEFLA	"+"
132	ALLNAILHSA	"+"
133	RTFEKIEEV	"+"
136	KLFDIFSQQV	"++"
141	AVIEHLERL	"+"
142	SLVQRVETI	"+"
150	RLADLEALKV	"++"

EJEMPLO 4

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida estándar con el contrastado método de Fmoc.

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

EJEMPLO 5

Ensayos de unión a MHC

Los péptidos candidatos para las terapias basadas en linfocitos T según la presente invención fueron analizados de forma adicional para comprobar su capacidad de unión (afinidad) a MHC. Los complejos de péptidos individuales-MHC se produjeron mediante intercambio de UV-ligando, una técnica en la que un péptido sensible a la luz UV se escinde tras la irradiación con luz UV, y se intercambia con el péptido de interés según el análisis. Solo los péptidos candidatos que se pueden unir y estabilizar de forma eficaz a las moléculas de MHC sensibles al péptido son capaces de impedir la disociación de los complejos de MHC. Para determinar el rendimiento de la relación de intercambio se realizó una prueba de ELISA basada en la detección de la cadena ligera ($\beta 2m$) de los

complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo como se describe de forma general en Rodenko y cols. (Rodenko et al., 2006).

Se recubrieron placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) durante toda la noche con 2 µg/ml de estreptavidina en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4x y se bloquearon durante 1 h a 37 °C en tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Los monómeros de HLA-A*02:01/MLA-001 replegados servían como patrones, y cubrían un intervalo de 15-500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC de la reacción de intercambio con luz UV se diluyeron 100 veces en tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con 2 µg/ml de anticuerpo anti-β2m conjugado con HRP durante 1 h a 37 °C, se lavaron otra vez y se detectaron con solución de TMB, y la reacción se detuvo con NH₂SO₄. Se midió la absorción a 450 nm. Los péptidos candidatos que muestran un elevado rendimiento de intercambio (preferiblemente superior al 50%, y lo más preferiblemente superior al 75%) son generalmente preferidos para la generación y producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o fragmentos de los mismos, ya que presentan suficiente afinidad por las moléculas de MHC e impiden la disociación de los complejos de MHC.

Tabla 11: Puntuaciones de unión a MHC de clase I

La unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I al HLA-A*02:01 se clasificó según el rendimiento del intercambio de péptido: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; ≥ 50 = +++; $\geq 75\%$ = ++++; J = Fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio de péptido
1	ALIKQLFEA	"+++"
2	ALLPRYFFL	"++"
3	RLIPDTLYSV	"++++"
4	RLAELTVDEFL	"+++"
5	WLFDDGGLTL	"++++"
6	FLAELPGSLSL	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio de péptido
7	YLTRHLAVL	"++"
8	ALMLQGVDLL	"+++"
9	ILDDHLSRV	"++"
10	RMYNKIFAI	"+++"
11	YLFKETFNM	"+++"
12	ALVQGILERV	"+++"
13	FLLAEDTKV	"+++"
14	FLDKPEDVLL	"++"
15	LQLDKEFQL	"+++"
16	VLVDQSWVL	"+++"
17	ALAAARVEL	"+++"
18	FLSSLKGGLL	"+++"
19	RLYTKLLNEA	"+++"
20	YLKDGDVML	"+++"
21	VLIDHRWVL	"+++"
22	GLIDEVMVL	"+++"
23	FLDANGHFV	"+++"
24	VLDGVLMEI	"+++"
25	SLADRLIGV	"++++"
26	GLASKENFSNVSL	"++"
27	LLADEDSSYL	"++"
28	ALTEIQEFI	"++++"
29	QMLDVAIRV	"+++"
30	GLSSAYGGL	"+"
31	LLYGKYVSV	"+++"
32	KLNTETFGV	"++"
33	ALWEKNTHL	"+++"
34	ILLEKSVSV	"+++"
35	KLLDLTVRI	"+++"
36	GLLESPSIFNFTA	"+++"
37	GLFAGLGGAGA	"+++"
38	SLAPTPVSA	"++"
40	ALSNVIHKV	"++"
41	ILDDSFKLL	"++"
42	SILDDSFKL	"++++"
43	TLDAAQPRV	"++"
44	SLESKLTSV	"+++"
45	ALAELLHGA	"+++"
46	GLDDRYSLV	"+++"
47	KLYERCEVV	"++"
48	FLDASDPAL	"++"
50	TLMAEMHVV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio de péptido
51	QVWEIQHTV	"++"
52	ALDSSNSMQTI	"++"
53	FLLGSEIKL	"+++"
54	ALLNGEYLLAA	"+++"
56	VLFTDEGVPKFL	"++"
57	NLLEKENYL	"+++"
58	AMADKMDMSL	"++"
59	LLTDNVVKL	"+++"
60	VLDEDEPRFL	"++"
61	KLLKLFQGV	"+++"
62	YLAPENGYL	"++"
63	KLFSILSTV	"++"
64	KTLGKLWRL	"++"
66	GLDDGPDFL	"++"
67	SLNDLEKDVMLL	"+++"
68	SILQFVHMV	"+++"
69	GMLNEAEGKAIKL	"++"
70	MISELEVRL	"+++"
71	RLWTEIPTAI	"+++"
72	YLLDYPNNLL	"+++"
73	YLFDAVSM	"+++"
74	YLMGFLHAV	"+++"
75	EMIENIQSV	"++"
76	YLIGEKQHYL	"+++"
77	SLLKRDFGA	"++"
78	ALDPELLLL	"++"
79	SLAADQLLKL	"++"
80	QVDEVVDIMRV	"++"
81	ALLSQQTHL	"+++"
82	QLYEEDTKL	"++"
83	LTIEDGIFEV	"+++"
84	SMVEDITGLRL	"+++"
85	ILHDINSBGVL	"++"
86	KVFPKGISV	"++"
87	LLFDAPDLRL	"+++"
88	KLDIKVETV	"++++"
89	SLIEYEFV	"+++"
90	GLLKPGLNVVL	"+++"
91	TVDVATPSV	"+++"
92	WIDDTSAFV	"+++"
93	SLQELRLLL	"++++"
94	KSMDIVLTV	"+++"
95	AILDAHIEV	"++++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio de péptido
96	KLYSRLVYV	"++"
97	ALWWGVVTV	"++"
98	AMNGKSFSV	"++"
99	KLLEVDLDTV	"+++"
100	SLDDFLATA	"+++"
101	GLSEGHTFQV	"+++"
102	KILVSLIEV	"+++"
103	FLFGYPKRL	"++"
104	ILLTIKDDTIYL	"+++"
105	YALDLSTFL	"+++"
106	SLISEKILL	"+++"
107	ALLGGGPYML	"+++"
108	SLAELVPGVGGI	"+++"
109	ALDGDQMEL	"++"
110	LLGELPRLLLL	"+++"
112	KLGGVLIYL	"++"
113	ILYDLQQNL	"++"
114	TAVGHALVL	"+"
115	SLFDVSHML	"+++"
116	LVYQFVHPI	"++"
117	TLQPVDNSTISL	"++"
118	LLADLKTMV	"+++"
119	ILYQTVTGL	"++"
120	VLYEGVDEV	"++"
121	SLAPNIISQL	"+++"
122	SLMGMVLKL	"+++"
123	KTLERSYLL	"++"
124	RVLPPSALQSV	"+++"
125	KLGDFFGLLVEL	"++++"
126	TLAKYLMEL	"+++"
127	RLAELTVDEFLA	"+++"
128	MLDDRAYLV	"++"
129	VLIDVLKEL	"+++"
130	GLGGSQIDTHL	"++"
131	KLLDVVHPA	"++"
132	ALLNAILHSA	"+++"
133	RTFEKIEEV	"++"
134	GVAGGSILKGV	"++++"
135	KLQEEIPVL	"++"
136	KLFDIFSQQV	"+++"
137	QLTEIKPLL	"+++"
138	KQFEGTVEI	"+++"
139	VLLNEILEQV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio de péptido
140	LLNEILEQV	"+++"
141	AVIEHLERL	"++++"
142	SLVQRVETI	"+++"
143	KLSDVWKEL	"+++"
144	LLNDRIWLA	"+++"
145	LLLEVVKQV	"+++"
146	ALSDETWGL	"++"
147	TLTELRAFL	"++++"
148	RLLNMTEVV	"+++"
149	YQFDKVGILTL	"+++"
150	RLADLEALKV	"+++"
151	SAQGSDVSLTACKV	"+++"
152	KLLAVIHEL	"++"
153	ILFSEDSTKLFV	"+++"
154	KLPSETIFVGC	"+++"
155	RLLGEEVVRV	"+++"
156	SLMMTIINL	"++++"
157	SLIERDLKL	"+++"
158	GLLDPSVFHV	"+++"
159	VLVDDDGIKVV	"++"
160	KLLEFDQLQL	"+++"
161	FLKNELDNV	"+++"
162	KLMDYIDEL	"+++"
163	RLLHEVQEL	"+++"
164	KMLDEILLQL	"++++"
165	RLLDFPEAMVL	"++++"
166	GLLEARGILGL	"+++"
167	SVIDHIHLISV	"+++"
168	GLIRFPLMTI	"+++"
169	YLAHFIEGL	"+++"
170	ALAGGITMV	"+++"
171	RLQETEGMVAV	"++"
172	LLLDTVTMQV	"+++"
173	KLGDLMVLL	"+++"
174	ILLDDNMQIRL	"++++"
175	TLLGGKEAQALGV	"+++"
176	RTLDKVLEV	"++"
177	ALLQGAIESV	"+++"
178	YLFREPATI	"++"
179	RLLJPLSSA	"+++"
181	NLFDLGGQYLRV	"+++"
182	SLNKWIFTV	"++++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio de péptido
183	TLQEVVTGV	"+++"
184	SLLDENNVSSYL	"+++"
185	VLYTGVVRV	"+++"
186	KMSEKILL	"+++"
187	GLHNVVYGI	"+++"
188	FLVDGPRVQL	"+++"
189	AISEVIGKITA	"+++"
190	AMAEMVLQV	"+++"
191	QLFSEIHNL	"++++"

EJEMPLO 6

Cuantificación absoluta de péptidos asociados a tumores presentes en la superficie celular

La generación de moléculas de unión tales como anticuerpos y/o TCR es un proceso laborioso que solo puede llevarse a cabo con algunas dianas selectas. En el caso de los péptidos asociados a tumores, o específicos de los mismos, los criterios de selección incluyen, sin limitación, la exclusividad de la presentación y la densidad del péptido presentado en la superficie celular. Además del aislamiento y la cuantificación relativa de los péptidos descritos en el ejemplo 1, los inventores analizaron también el número absoluto de copias de los péptidos por célula tal y como se describe en la patente X. La cuantificación de las copias de TUMAP por célula en muestras de tumores sólidos requiere la cuantificación absoluta de los TUMAP aislados, la medición de la eficacia del aislamiento de TUMAP, y el recuento de células en la muestra de tejido analizada. En la Figura 4 se ofrece una visión general de nuestro abordaje experimental, con las etapas experimentales descritas a continuación.

Cuantificación de los péptidos por nano-CL-EM/EM

Para llevar a cabo una cuantificación precisa de los péptidos por espectrometría de masas se generó una curva de calibración para cada péptido utilizando el método con patrón interno. El patrón interno es una variante, marcada con dos isótopos, de cada péptido, es decir: se incluyeron dos aminoácidos marcados con isótopos en la síntesis de los TUMAP. La diferencia con el péptido asociado al tumor reside solo en su masa,

sin que haya diferencias en otras propiedades fisicoquímicas (Anderson et al., 2012).. Se hicieron adiciones del patrón interno a cada muestra de EM y todas las señales de EM se normalizaron para tener en cuenta la señal de EM del patrón interno y contrarrestar posibles variaciones técnicas entre los experimentos de EM.

Las curvas de calibración se prepararon en un mínimo de tres matrices distintas, a saber: las muestras eluidas de HLA-péptido procedentes de muestras naturales similares a las muestras habituales de EM, y cada preparación se midió en tandas duplicadas de EM. Para la evaluación, se normalizaron las señales de EM para tener en cuenta la señal del patrón interno, y se calculó una curva de calibración mediante regresión logística.

Para la cuantificación de los péptidos asociados a tumores procedentes de las muestras de tejido, las muestras respectivas recibieron también adiciones del patrón interno, se normalizaron las señales de EM para tener en cuenta el patrón interno y se cuantificaron utilizando la curva de calibración del péptido.

Eficacia del aislamiento de péptido/MHC

Como en cualquier proceso de purificación de proteínas, el aislamiento de proteínas procedentes de las muestras de tejido conlleva una determinada pérdida de la proteína en cuestión. Para determinar la eficacia del aislamiento de TUMAP se generaron complejos péptido/MHC de todos los TUMAP seleccionados para la cuantificación absoluta. Con el fin de discriminar entre los complejos de péptido/MHC naturales y los procedentes de adiciones, se utilizaron versiones de los TUMAP marcadas con un solo isótopo, es decir: se incluyó un aminoácido marcado con isótopo en la síntesis de TUMAP. Estos complejos se añadieron a los lisados de tejido recién preparados, es decir: lo antes posible durante el procedimiento de aislamiento de TUMAP, y después se capturaron como se hace con los complejos péptido/MHC naturales en la purificación posterior por afinidad. Por lo tanto, la medición de la recuperación de los TUMAP con marcador único permite alcanzar conclusiones relativas a la eficacia del aislamiento de los TUMAP individuales naturales. La eficacia del aislamiento se analizó en unas pocas muestras y resultó comparable entre estas muestras de tejido. En contraposición, la

eficacia del aislamiento es distinta entre péptidos individuales. Esto indica que la eficacia del aislamiento, aunque se ha determinado solo en un escaso número de muestras de tejido, puede extrapolarse a la de cualquier otra preparación de tejido. Sin embargo, es necesario analizar cada TUMAP de forma individual, ya que la eficacia del aislamiento no puede extrapolarse de un péptido a los otros.

Determinación del recuento de células en tejido sólido congelado

Con objeto de determinar el recuento de células de las muestras de tejido sometidas a la cuantificación absoluta de péptidos, los inventores utilizaron el análisis del contenido de ADN. Este método es aplicable a una amplia gama de muestras de diversos orígenes y, lo que es más importante, a muestras congeladas (Forsey and Chaudhuri, 2009; Alcoser et al., 2011; Silva et al., 2013). Durante el protocolo de aislamiento de los péptidos se procesa una muestra de tejido hasta obtener un lisado homogéneo, y de este lisado se extrae una pequeña cantidad alícuota. La cantidad alícuota se divide en tres partes, de las que se aísla el ADN (QiaAmp ADN Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemania). El contenido de ADN total de cada tanda de aislamiento de ADN se cuantifica utilizando un ensayo de cuantificación de ADN basado en fluorescencia (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Alemania) como mínimo por duplicado. Con el fin de calcular el número de células se generó una curva estándar de ADN a partir de muestras alícuotas de células sanguíneas sanas únicas, con un intervalo de números de células definidos. La curva estándar se utilizó para calcular el contenido total de células a partir del contenido total de ADN de cada aislamiento de ADN. La media del recuento total de células de la muestra de tejido utilizada para el aislamiento del péptido se extrapola teniendo en cuenta el volumen conocido de las partes alícuotas del lisado y el volumen total del lisado.

Copias del péptido por célula

Con los datos de los experimentos mencionados anteriormente los inventores calcularon el número de copias de TUMAP por célula dividiendo la cantidad total de péptido por el recuento total de células de la muestra, seguido por la división por la eficacia del

aislamiento. En la Tabla 12 se muestran los números de copias por célula correspondientes a péptidos seleccionados.

Tabla 12: Números absolutos de copias. En la tabla se enumeran los resultados de la cuantificación absoluta de los péptidos en las muestras tumorales de NSCLC. La mediana del número de copias por célula se indica para cada péptido: <100 = +; >=100 = ++; >=1000 +++; >=10 000 = +++. Se indican los números de muestras para las que se disponía de datos evaluables de EM de alta calidad.

SEC. ID N.º	Código del péptido	Copias por célula (mediana)	Número de muestras
1	ZNF-002	+	19
142	ECT2-001	+	18
22	CYP2W1-001	++	23
152	RAD54B-002	+++	6

Lista de referencias bibliográficas

- Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933
- Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902
- Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814
- Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brossart, P. et al., Blood **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004): 29-43

- Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 345-357
- Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. **65** (2004): 1211-1223
- Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., J Immunol **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114
- Coligan JE et al., (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol **171** (2003): 2197-2207
- Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. **2** (1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., Nat Rev.Immunol **6** (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997): 905-911
- Green MR et al., **4th**, (2012)
- Greenfield EA, **2nd**, (2014)
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Kibbe AH, **rd**, (2000)
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795

- Lundblad RL, **3rd**, (2004)
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638
- Pinheiro J et al., (2015)
- Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., Virology **202** (1994): 949-955
- Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219
- Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132
- Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- Sherman F et al., (1986)
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., Science **344** (2014): 641-645
- Walter, S. et al., J Immunol **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261

- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Albrecht, M. et al., FEBS Lett. **569** (2004): 18-26
- Albulescu, R., Biomark.Med. **7** (2013): 203
- Aschauer, H. et al., Wien.Klin.Wochenschr. **95** (1983): 785-788
- Aung, P. P. et al., Oncogene **25** (2006): 2546-2557
- Backen, A. C. et al., Br.J Cancer **96** (2007): 1544-1548
- Bai, J. et al., PLoS.One. **8** (2013b): e59772
- Bailey, C. M. et al., J Cell Physiol **209** (2006): 617-624
- Baris, O. et al., J Clin Endocrinol.Metab **89** (2004): 994-1005
- Becker, T. M. et al., Mol.Cancer **8** (2009): 4
- Bie, L. et al., PLoS.One. **6** (2011): e25631
- Bilbao-Aldaiturriaga, N. et al., Pediatr.Blood Cancer **62** (2015): 766-769
- Boland, A. et al., Nat Struct.Mol.Biol **20** (2013): 1289-1297
- Bulk, E. et al., Int.J Cancer **137** (2015): 1306-1317
- Cao, R. et al., Br.J Cancer **111** (2014): 539-550
- Carvalho, L. et al., Rev Port.Pneumol. **15** (2009): 683-696
- Chang, H. Y. et al., PLoS.One. **8** (2013): e54117
- Chen, C. H. et al., Oncotarget. **5** (2014a): 6300-6311
- Chen, Y. D. et al., Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi. **30** (2012): 725-729
- Chou, C. C. et al., Expert.Rev Mol.Diagn. **8** (2008): 179-187
- Chung, F. Y. et al., J Surg.Oncol **102** (2010): 148-153
- Cohen, Y. et al., Hematology. **19** (2014): 286-292
- Cole, C. L. et al., J Biol Chem **289** (2014): 10488-10501

- Courson, D. S. et al., *Exp.Cell Res* **334** (2015): 10-15
- Di, Maro G. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* **99** (2014): E1617-E1626
- Ding, K. et al., *Med.Hypotheses* **83** (2014): 359-364
- Doherty, J. A. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **20** (2011): 1873-1882
- Duursma, A. et al., *Mol.Cell Biol* **25** (2005): 6937-6947
- Egloff, A. M. et al., *Cancer Res* **66** (2006): 6-9
- Fan, C. G. et al., *Oncol Rep.* **26** (2011): 1281-1286
- Fang, Y. et al., *Cancer Biol Ther.* **15** (2014): 1268-1279
- Fang, Z. et al., *J Biol Chem* **288** (2013): 7918-7929
- Fang, Z. Q. et al., *Genet.Mol Res* **12** (2013): 1479-1489
- Feng, B. et al., *J Gastroenterol.Hepatol.* **21** (2006): 1596-1603
- Ferreras, C. et al., *J Biol Chem* **287** (2012): 36132-36146
- Fields, A. P. et al., *Adv.Enzyme Regul.* **50** (2010): 190-200
- Flanagan, J. M. et al., *Mol.Cancer Ther.* **8** (2009): 249-260
- Freed, E. F. et al., *PLoS.Genet.* **8** (2012): e1002892
- Goldenson, B. et al., *Oncogene* **34** (2015): 537-545
- Gomez, A. et al., *Mol.Pharmacol.* **78** (2010): 1004-1011
- Griffin, J. N. et al., *PLoS.Genet.* **11** (2015): e1005018
- Gutierrez-Camino, A. et al., *Pediatr.Res* **75** (2014): 767-773
- Ham, M. F. et al., *Cancer Sci.* **98** (2007): 1041-1047
- Hanks, T. S. et al., *Apoptosis.* **17** (2012): 236-247
- Haren, N. et al., *Histol.Histopathol.* **25** (2010): 1247-1255
- Hatabe, S. et al., *Mol.Clin Oncol* **1** (2013): 845-850
- Hayama, S. et al., *Cancer Res* **67** (2007): 4113-4122
- Hegyí, K. et al., *Pathobiology* **79** (2012): 314-322

- Hill, S. J. et al., *Genes Dev.* **28** (2014): 1957-1975
- Hiramoto, T. et al., *Oncogene* **18** (1999): 3422-3426
- Hu, J. et al., *Pituitary*. **10** (2007): 47-52
- Hu, S. X. et al., *Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi.* **31** (2013): 890-894
- Huff, L. P. et al., *Genes Cancer* **4** (2013): 460-475
- Ishikawa, N. et al., *Cancer Sci.* **97** (2006): 737-745
- Ito, K. et al., *Protein Cell* **2** (2011): 755-763
- Jager, D. et al., *Cancer Res* **60** (2000): 3584-3591
- Januchowski, R. et al., *Biomed.Res Int* **2014** (2014): 365867
- Jin, Y. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014): 8724-8731
- Jordheim, L. P. et al., *Biomark.Med.* **7** (2013): 663-671
- Jordheim, L. P. et al., *Lancet Oncol* **12** (2011): 693-702
- Ju, W. et al., *Oncol.Res.* **18** (2009): 47-56
- Kanda, A. et al., *Oncogene* **24** (2005): 7266-7272
- Kaplun, A. et al., *Crit Rev Eukaryot.Gene Expr.* **22** (2012): 249-258
- Karlgrén, M. et al., *Expert.Opin.Ther.Targets.* **11** (2007): 61-67
- Kas, K. et al., *J Biol Chem* **273** (1998): 23026-23032
- Kaur, S. et al., *BMC.Cell Biol* **9** (2008): 61
- Kim, D. H., *Yonsei Med.J* **48** (2007): 694-700
- Kim, D. S. et al., *J Proteome.Res* **9** (2010a): 3710-3719
- Kim, J. E. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* **136** (2010b): 47-53
- Kounelakis, M. G. et al., *IEEE J Biomed.Health Inform.* **17** (2013): 128-135
- Lages, E. et al., *PLoS.One.* **6** (2011): e20600
- Lallet-Daher, H. et al., *Oncogene* **28** (2009): 1792-1806
- Landrette, S. F. et al., *Blood* **105** (2005): 2900-2907

- Langnaese, K. et al., Cytogenet.Cell Genet. **94** (2001): 233-240
- Lee, Y. C. et al., Int.J Cancer **122** (2008b): 1630-1638
- Li, B. et al., Cancer Res **61** (2001): 8014-8021
- Li, G. H. et al., Bioinformatics. **30** (2014): 748-752
- Li, J. F. et al., Zhonghua Wei Chang Wai Ke.Za Zhi. **15** (2012): 388-391
- Li, Y. et al., PLoS.One. **8** (2013): e84489
- Liu, B. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014a): 3089-3100
- Liu, L. et al., Retrovirology. **8** (2011a): 94
- Liu, X. et al., Eur.J Cancer **50** (2014b): 2251-2262
- Liu, Y. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **18** (2009): 204-214
- Liu, Y. et al., J Cancer **6** (2015b): 643-651
- Lonardo, F. et al., Curr.Pharm.Des **16** (2010): 1877-1881
- Lu, X. et al., Mol.Cancer Ther. **3** (2004): 861-872
- Maass, N. et al., Acta Oncol **39** (2000): 931-934
- Marchi, S. et al., Cell Death.Dis. **3** (2012): e304
- Marioni, G. et al., Acta Otolaryngol. **129** (2009): 476-480
- Marnef, A. et al., Int.J Biochem.Cell Biol **41** (2009): 977-981
- Martin, L. et al., Oncogene **31** (2012): 4076-4084
- Mason, J. M. et al., Nucleic Acids Res. **43** (2015): 3180-3196
- Matsuda, R. et al., Br.J Cancer **104** (2011): 376-386
- Medina, P. P. et al., Epigenetics. **3** (2008): 64-68
- Mound, A. et al., Eur.J Cancer **49** (2013): 3738-3751
- Naidu, S. R. et al., Oncogene **28** (2009): 2492-2501
- Ng, Y. et al., J Biol Chem **279** (2004): 34156-34164
- Nibbe, R. K. et al., Mol Cell Proteomics. **8** (2009): 827-845

- Nishida, C. R. et al., Mol.Pharmacol. **78** (2010): 497-502
- O'Geen, H. et al., PLoS.Genet. **3** (2007): e89
- Ota, T. et al., Cancer Res **62** (2002): 5168-5177
- Paliouras, M. et al., Tumour.Biol **29** (2008): 63-75
- Papageorgio, C. et al., Int.J Oncol. **31** (2007): 1205-1211
- Papageorgis, P. et al., Cancer Res **70** (2010): 968-978
- Pohl, A. et al., Pharmacogenomics.J **11** (2011): 93-99
- Pollari, S. et al., Mol.Cancer Res **10** (2012): 597-604
- Qi, F. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **8** (2015): 1666-1673
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Reisman, D. N. et al., Cancer Res **63** (2003): 560-566
- Robles, L. D. et al., J Biol Chem **277** (2002): 25431-25438
- Ryu, B. et al., PLoS.One. **2** (2007): e594
- Sager, R. et al., Curr.Top.Microbiol.Immunol. **213 (Pt 1)** (1996): 51-64
- Sakakura, C. et al., Anticancer Res **23** (2003): 3691-3697
- Sakurai, Y. et al., Mol.Pharm. **11** (2014): 2713-2719
- Sakurikar, N. et al., J Biol Chem **287** (2012): 39193-39204
- Sheng, S., Front Biosci. **9** (2004): 2733-2745
- Shibao, K. et al., Cell Calcium **48** (2010): 315-323
- Shu, G. S. et al., Cancer Biomark. **11** (2012): 107-114
- Stone, B. et al., Gene **267** (2001): 173-182
- Strekalova, E. et al., Clin.Cancer Res. (2015)
- Stutzer, I. et al., J Biol Chem **288** (2013): 10536-10547
- Su, K. C. et al., Dev.Cell **21** (2011): 1104-1115
- Sun, Y. et al., Oncotarget. **6** (2015b): 8244-8254

- Takashima, S. et al., Tumour.Biol. **35** (2014): 4257-4265
- Tatsuka, M. et al., Cancer Res **58** (1998): 4811-4816
- Tsui, K. H. et al., Sci.Rep. **5** (2015): 12870
- Van Ginkel, P. R. et al., Biochim.Biophys.Acta **1448** (1998): 290-297
- Vanaja, D. K. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 1128-1136
- Wang, G. et al., Oncogene **35** (2016): 651-661
- Wang, G. et al., Tumour.Biol **36** (2015a): 1055-1065
- Wang, Q. et al., PLoS.One. **8** (2013d): e70191
- Wang, W. et al., Int.J Cancer **124** (2009b): 521-530
- Wang, W. X. et al., Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban. **40** (2009c): 857-860
- Wierinckx, A. et al., Endocr.Relat Cancer **14** (2007): 887-900
- Williams, K. A. et al., PLoS.Genet. **10** (2014): e1004809
- Wu, M. X., Apoptosis. **8** (2003): 11-18
- Wu, M. X. et al., Expert.Opin.Ther.Targets. **17** (2013): 593-606
- Wu, S. et al., Cell Cycle **13** (2014a): 2869-2878
- Wu, Z. et al., Neoplasia. **11** (2009): 66-76
- Xu, F. et al., Biochem.J **416** (2008): 15-26
- Yang, J. et al., Surg.Oncol **22** (2013): e53-e57
- Yang, L. et al., Cancer Res **71** (2011a): 5558-5568
- Yang, L. et al., Future.Oncol **8** (2012): 431-440
- Yang, X. et al., Biomed.Pharmacother. **67** (2013): 681-684
- Yang, Y. S. et al., Lung Cancer **74** (2011b): 12-24
- Yousef, G. M. et al., Tumour.Biol **26** (2005): 227-235
- Yu, B. et al., Exp.Cell Res **315** (2009): 3086-3098
- Zhang, F. et al., J Viral Hepat. **21** (2014a): 241-250

- Zhang, K. et al., Tumour.Biol **35** (2014e): 7669-7673
- Zhang, M. et al., Zhong.Nan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban. **36** (2011a): 274-276
- Zhang, Y. et al., Cancer Sci. **101** (2010): 934-940
- Zheng, G. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **364** (2007): 344-350
- Follenzi A, et al. Nat Genet. 2000 Jun;25(2):217-22.
- Zufferey R, et al. J Virol. 1999 Apr;73(4):2886-92.
- Scholten KB, et al. Clin Immunol. 2006 May;119(2):135-45.
- Gustafsson C, et al. Trends Biotechnol. 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
- Kuball, J., et al. (2007). *Blood* 109, 2331–2338.
- Schmitt, T. M., et al. (2009). *Hum. Gene Ther.* 20, 1240–1248