P-11050

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. **16-022.420**
Solicitud de patente a nombre de **IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad **IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH**, domiciliada en Tubinga, Alemania, solicitante de la patente de la referencia, me permito manifestar:

1. Solicitud divisional

Con fundamento en la facultad que confiere el Artículo 36 de la Decisión 486/00 al solicitante para dividir su solicitud en dos o más fraccionarias en cualquier momento del trámite, me permito presentar junto con este memorial una solicitud divisional para la presente solicitud, la cual será denominada en este documento como 16-022.420C.

Con relación a esta solicitud divisional, el solicitante manifiesta que las reivindicaciones 1 a 23 de la misma se encuentran debidamente soportadas por la información contenida en el capítulo descriptivo originalmente presentado. Cabe aclarar que las reivindicaciones 1 a 23 a ser estudiadas en la solicitud divisional No. 16-022.420C se encuentran dirigidas a la materia del grupo inventivo 75 (SEQ ID No. 92) eliminado de la solicitud parental No. 16-022.420 en respuesta a la objeción de unidad de invención planteada por el examinador en el oficio de fondo No. 14747 de 2017.

Con el fin de llevar a cabo el estudio de la solicitud divisional, se presenta junto con este memorial: (i) los recibos de pago con los cuales quedan cubiertas las tasas correspondientes a una solicitud de patente de invención, examen de patentabilidad y 13 reivindicaciones adicionales; y (ii) la descripción restringida según la materia reclamada

en las reivindicaciones 1 a 23 a ser estudiadas.

Asimismo, me permito aclarar que no se presenta división literal de las reivindicaciones ni se realiza pago por modificación voluntaria de las mismas ya que esta solicitud divisional es resultado de una objeción de unidad de invención planteada por esa Oficina durante el trámite de la solicitud parental.

Finalmente, agradezco se tengan en cuenta para esta solicitud divisional todos los documentos legales que se encuentran en el expediente de la solicitud original, tal como cesión de derechos y el poder de abogado.

2. <u>Anexos</u>

2.1. Capítulo reivindicatorio que comprende 23 reivindicaciones.
2.2. Descripción restringida.
2.3. Resumen modificado.
2.4. Figuras restringidas.
2.5. Listado de secuencias restringido.
2.6. Comprobante de pago de tasa por solicitud de patente de invención.
2.7. Comprobante de pago de tasa por examen de patentabilidad.
2.8. Comprobante de pago de tasa por 13 reivindicaciones adicionales.

Señor Director,

CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

Reivindicaciones

1. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 92, o una secuencia variante de la misma que es homóloga al menos en un 80% a la SEQ ID No. 92, en que dicha variante estimula anticuerpos y/o linfocitos T que se unen específicamente a dicho péptido, o una sal farmacéuticamente aceptable de la SEQ ID No. 92, en que dicho péptido no es el polipéptido subyacente entero.

2. Péptido conforme a la reivindicación 1, en que dicho péptido o 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.

3. Péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II.

4. Péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho péptido consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID No. 92.

5. Péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que dicho péptido es modificado, alargado por los extremos N-terminal y/o C-terminal con hasta cuatro aminoácidos, y/o incorpora enlaces no peptídicos.

6. Péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, en particular fusionada a los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii), o está fusionado con un anticuerpo.

7. Ácido nucleico que codifica un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Ácido nucleico conforme a la reivindicación 7, que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos.

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

10. Célula hospedadora que comprende el ácido nucleico conforme a la reivindicación 7 u 8 o el vector de expresión conforme a la reivindicación 9, en que dicha célula hospedadora no es una célula madre embrionaria humana.

11. Célula hospedadora conforme a la reivindicación 10, en que dicha célula es una célula presentadora de antígeno, como por ejemplo una célula dendrítica.

12. Composición farmacéutica que comprende el péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos otro componente seleccionado de un grupo de vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, preferiblemente vehículos y/o excipientes acuosos, como soluciones tamponadoras, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, aromas, lubricantes, y sustancias estimuladoras o moduladoras del sistema inmunitario, como citocinas, inmuno-moduladores, adyuvantes y sustancias terapéuticas con propiedades inmunomoduladoras.

13. Método para producir el péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho método el cultivo de la célula hospedadora conforme a la reivindicación 10 u 11 y el aislamiento de dicho péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

14. Método *in vitro* para producir un linfocito T citotóxico (CTL) o un linfocito T cooperador (linfocito Th) activados, comprendiendo dicho método la puesta en contacto *in vitro* de CTL o de linfocitos Th con moléculas MHC de clase I o II humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar dicho CTL de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno el péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

15. Método conforme a la reivindicación 14, en que dicho antígeno está cargado en moléculas MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de dicho antígeno con dicha célula presentadora de antígeno.

16. Método conforme a la reivindicación 14 o 15, en que dicha célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

17. Linfocito T citotóxico (CTL) o linfocito T cooperador (linfocito Th) activados, producidos con el método conforme a cualquier de las reivindicaciones 14 a 16, en que dicho CTL o linfocito Th reconoce selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la expuesta en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

18. Método *in vitro* para producir un TCR o sTCR o un fragmento de los mismos que es específico para el péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo la clonación de dominios variables de un linfocito T citotóxico (CTL) o un linfocito T cooperador (linfocito Th) activados conforme a la reivindicación 17, y la expresión de dichos TCR o sTCR o un fragmento de los mismos en un hospedador y/o sistema de expresión adecuados.

19. Agente de unión aislado, como un anticuerpo o fragmento del mismo, una proteína, un ácido nucleico, un péptido, un TCR o un sTCR o un fragmento de los mismos que se une, y preferiblemente se une específicamente al péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o a un complejo formado por el péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con una molécula MHC.

20. Receptor de linfocito T aislado que reacciona con un ligando HLA que es al menos un 80% idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID No. 92.

21. El receptor de linfocito T aislado de la reivindicación 20, en que dicha secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 90%, preferiblemente en un 95%, y más preferiblemente 100% idéntica a la SEQ ID No. 92.

22. Linfocito T citotóxico (CTL) o linfocito T cooperador (linfocito Th) humanos autólogos o alogénicos, transfectados mediante técnicas recombinantes con un receptor de linfocito T conforme a la reivindicación 19.

23. Composición farmacéutica que comprende:

(a) Entidad seleccionada de grupo consistente en:
(a1) péptido aislado conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
(a2) receptor de linfocito T, sTCR o fragmento de los mismos conforme a cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21,
(a3) proteína de fusión conforme a la reivindicación 6,
(a4) ácido nucleico conforme a la reivindicación 7 u 8,
(a5) vector de expresión conforme a la reivindicación 9,
(a6) célula hospedadora conforme a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, y
(a7) linfocito T citotóxico o linfocito T cooperador conforme a la reivindicación 17, y
(b) vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente

(c) al menos otro componente seleccionado del grupo de excipientes farmacéuticamente aceptables, como soluciones tamponadoras, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, aromas, lubricantes, y sustancias estimuladoras o moduladoras del sistema inmunitario como citocinas, inmunomoduladores, adyuvantes y sustancias terapéuticas con propiedades inmunomoduladoras.

I32387WO-C

Nueva inmunoterapia contra diversos tumores como el cáncer de pulmón, incluido el carcinoma de pulmón amicrocítico (NSCLC)

La presente invención se refiere a péptidos, ácidos nucleicos y células para la utilización en métodos inmunoterapéuticos. En concreto, la presente invención se refiere a la inmunoterapia contra el cáncer. La presente invención se refiere, además, a epítopos peptídicos de linfocitos T citotóxicos (CTL) asociados a tumor, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumor que sirven como principios activos farmacéuticos de composiciones vacunales que estimulan respuestas inmunitarias antitumorales. La presente invención se refiere a nuevas secuencias peptídicas y sus variantes derivadas de moléculas HLA de clase I y clase II de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales.

Antecedentes de la invención

El cáncer de pulmón es el responsable de la mayoría de las muertes por cáncer en hombres y mujeres. Es el tipo de cáncer más importante en el mundo, tanto en términos de incidencia como de mortalidad. En el año 2008 se produjeron 1,61 millones de casos nuevos y 1,38 millones de muertes a causa del mismo. Europa y Norteamérica presentan las tasas más altas.

Desde 1987 el número de mujeres que fallece cada año a causa del cáncer de pulmón supera el de las fallecidas por cáncer de mama. En cambio, la mortalidad masculina ha descendido notablemente desde 1991 hasta 2003, con un ritmo aproximado del 1,9% anual. La mortalidad femenina por cáncer de pulmón se está estabilizando después de haber aumentado sin cesar durante varias décadas. Dichas tendencias en la mortalidad por cáncer de pulmón reflejan el descenso del consumo de tabaco en los últimos 30 años.

Según los cálculos del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI), en 2013 se producirán en ese país 230. 000 casos nuevos de cáncer de pulmón y 160. 000 muertes relacionadas con el mismo.

A efectos del tratamiento, el cáncer de pulmón se clasifica en microcítico o de células pequeñas (13%; SCLC, por sus siglas en inglés) y en amicrocítico o de células no pequeñas (87%; NSCLC, por sus siglas en inglés). El pronóstico es por lo general malo. En las personas con cáncer de pulmón, la supervivencia cinco años después del diagnóstico ronda el 15%. Con frecuencia en el momento del diagnóstico el cáncer ya presenta un estadio avanzado. En el diagnóstico, el 30%–40% de los casos de NSCLC se encuentra en el estadio IV y el 60% de los de SCLC se halla en ese mismo estadio IV.

El tratamiento depende del tipo (microcítico o amicrocítico) y del estadio tumoral y comprende: cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapias biológicas dirigidas como bevacizumab (AVASTIN®) y erlotinib (TARCEVA®). El tratamiento de elección para los tumores localizados suele ser la cirugía. Estudios recientes indican que la administración de quimioterapia después de la cirugía mejora la supervivencia en los casos en que el cáncer de pulmón amicrocítico se encuentra en estadios iniciales. Como

el cáncer suele estar diseminado en el momento en que es descubierto, con frecuencia se recurre simultáneamente a la radioterapia y la quimioterapia, a veces combinadas con la cirugía. El tratamiento de elección contra el cáncer de pulmón microcítico consiste en quimioterapia sola o combinada con radiación; con este régimen un gran porcentaje de pacientes experimenta remisión, que en ciertos casos es prolongada.

La supervivencia relativa a 1 año en el cáncer de pulmón ha mejorado ligeramente, pasando del 37% en 1975-1979 al 42% en 2002, en gran medida gracias a los avances en la técnica quirúrgica y los tratamientos combinados. No obstante, la supervivencia a 5 años en todos los estadios combinados apenas alcanza el 16%. Si el cáncer de pulmón se detecta cuando todavía está localizado la supervivencia aumenta hasta el 49%, pero solo el 16% de los casos se diagnostican en ese estadio inicial.

A la vista de esta situación, existe la necesidad de nuevas opciones terapéuticas eficaces y seguras contra las neoplasias malignas como el cáncer de pulmón, en particular contra el cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), el cáncer gástrico y los tumores cerebrales de diversos fenotipos, que mejoren el bienestar del paciente reduciendo el número de quimioterápicos y otros agentes que pueden causar efectos secundarios graves.

La presente invención emplea péptidos que estimulan el sistema inmunitario del paciente y que actúan como agentes antitumorales de forma no invasiva.

Resumen de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, la invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo integrado por la SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, y SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, y SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, y SEQ ID No. 92, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido un polipéptido entero.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de la presente invención que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, y SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, y SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, y SEQ ID No. 92, en que dicho péptido tiene una longitud total en el caso de las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 78 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92 de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos, y en el caso de las SEQ ID N.º 76 y 77 de entre 12 y 100, preferiblemente de entre 12 y 30, y más preferiblemente de entre 12 a 18 aminoácidos.

Las tablas siguientes muestran los péptidos conformes a la presente invención, sus respectivas SEQ ID N.º, y las posibles proteínas originarias de tales péptidos. Todos los péptidos de las Tablas 1a, 1b y 1c se unen al alelo HLA A*02, y los péptidos de la Tabla 1d se unen a los alelos HLA-DR. Los péptidos de la Tabla 1c son, además, útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer gástrico y/o del glioblastoma.

Los péptidos de clase II de la Tabla 1d son, además, útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer gástrico y otros tipos de cáncer que sobreexpresan o presentan en exceso la MMP12 o el POSTN.

Así pues, la presente invención se refiere en concreto a un péptido de la presente invención que comprende una secuencia conforme a la SEQ ID N.º 76 o una variante de la misma, que es homóloga al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%, (preferiblemente idéntica al menos en un 80% o al menos en un 90%) a la SEQ ID N.º 76, en que dicho péptido o variante del mismo tiene una longitud total de entre 12 y 100, preferiblemente de entre 12 y 30, y más preferiblemente de entre 12 a 18 aminoácidos. La presente invención se refiere en concreto a un péptido de la presente invención consistente en la secuencia conforme a la SEQ ID N.º 76.

Asimismo, la presente invención se refiere en concreto a un péptido de la presente invención que comprende una secuencia conforme a la SEQ ID N.º 77 o una variante de la misma, que es homóloga al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%, (preferiblemente idéntica al menos en un 80% o al menos en un 90%) a la SEQ ID N.º 77, en que dicho péptido o variante del mismo tiene una longitud total de entre 12 y 100, preferiblemente de entre 12 y 30, y más preferiblemente de entre 12 a 18 aminoácidos. La presente invención se refiere en concreto a un péptido de la presente invención consistente en la secuencia conforme a la SEQ ID N.º 77.

Tabla 1a: Péptidos de la presente invención

SEQ ID N.º:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
2	MMP12-003	KIQEMQHFL	MMP12
3	ABCA13-002	ALDENLHQL	ABCA13
4	DST-001	NLIEKSIYL	DST
6	DST-002	KLDETNNTL	DST
7	CDK4-001	TLWYRAPEV	CDK4/ CDK6
8	HNRNPH-001	SMSGYDQVL	HNRNPH1, HNRNPH2
9	TANC2-001	ALMDKEGLTAL	TANC2
10	RNF213-001	VLSVVEVTL	RNF213
11	SLC34A2-001	VLLPVEVATHYL	SLC34A2
12	SMYD3-001	SLIEDLILL	SMYD3
13	AKR-001	YLIHFPVSV	AKR1C1, AKR1C2
14	RCN1-001	FQYDHEAFL	RCN1,RCN3
15	IL8-001	KLAVALLAA	IL8
16	P2RY6-001	TVIGFLLPFA	P2RY6
17	HUWE1-001	RLLGPSAAADILQL	HUWE1
18	VCAN-001	TLYPHTSQV	VCAN
19	DROSHA-001	AVVEFLTSV	DROSHA
20	VCAN-002	ALVDHTPYL	VCAN
21	PLEKHA8-001	AILDTLYEV	PLEKHA8
22	ACACA-001	FLIPIYHQV	ACACA
23	ITGA11-001	FLHHLEIEL	ITGA11
24	COL12A1-002	FLVDGSWSV	COL12A1
25	ELANE-001	GLYPDAFAPV	ELANE
26	SERPINB3-001	KLFGEKTYL	SERPINB3
27	KIF26B-001	TVAEVIQSV	KIF26B

28	ANKH-001	SISDVIAQV	ANKH
29	NXF1-001	RLEEDDGDVAM	NXF1
30	RGS4-001	KIYNEFISV	RGS4
31	GFPT2-001	AIDGNNHEV	GFPT2
32	CERC-001	KLSWDLIYL	CERCAM
33	GALNT2-001	ALLRTVVSV	GALNT2
34	HNRNPM-001	ALGAGIERM	HNRNPM
35	BNC1-001	VLFPNLKTV	BNC1
36	FKBP10-001	TLVAIVVGV	FKBP10
37	FZD-001	VLAPLFVYL	FZD1, FZD2, FZD7
38	ATP-001	SLHFLILYV	ATP2A1, ATP2A2
39	LAMC2-001	RLLDSVSRL	LAMC2
40	MXRA5-002	GLTDNIHLV	MXRA5
41	HSP-002	SILTIEDGIFEV	HSPA2, HSPA8
42	VPS13B-001	SLWGGDVVL	VPS13B
43	CSE1-001	ALFPHLLQPV	CSE1L
44	DPYSL4-001	NLLAEIHGV	DPYSL4
45	SEC61G-001	AIMGFIGFFV	SEC61G
46	ORMDL1-002	TLTNIIHNL	ORMDL1
47	PCNXL3-001	GVLENIFGV	PCNXL3
48	SNRNP20-001	GLIEIISNA	SNRNP200

Tabla 1b: Péptidos adicionales de la presente invención

SEQ ID N.º:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
49	SAMSN1-001	RLLJAAENFL	SAMSN1
50	STAT2-001	SLLPVDIRQYL	STAT2
51	CNOT1-001	YLAPFLRNV	CNOT1
52	SHMT2-001	ALLERGYSL	SHMT2
53	JUNB-001	YLPHAPPFA	JUNB
54	TACC3-001	KLVEFDFLGA	TACC3
55	CNOT1-002	SLADFMQEV	CNOT1
56	RAD54B-001	SLYKGLLSV	RAD54B
57	EEF2-002	GLAEDIDKGEV	EEF2
58	CCNA2-001	SLIDADPYL	CCNA2
59	NET1-001	ILVSWLPRL	NET1
60	C11orf24-001	VVDKTLLLV	C11orf24
61	RCC1-001	TLISRLPAV	RCC1
62	MAGEF1-001	ILFPDIIARA	MAGEF1
63	NCAPD2-001	SLAGDVALQQL	NCAPD2
64	C12orf44-001	AMLAVLHTV	C12orf44
65	HERC4-001	KVLEILHRV	HERC4

Tabla 1c: Péptidos adicionales que también aparecen sobreexpresados en el glioblastoma y/o el cáncer gástrico

SEQ ID N.º:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
66	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3
67	CDC6-001	ILQDRLNQV	CDC6
68	FAP-003	YVYQNNIYL	FAP
69	WNT5A-001	AMSSKFFLV	WNT5A
70	TPX2-001	KILEDVVGV	TPX2
71	HMMR-001	KLLEYIEEI	HMMR
72	ADAM8-001	KLLTEVHAA	ADAM8
73	COL6A3-002	FLLDGSANV	COL6A3
74	THY1-001	SLLAQNTSWLL	THY1
75	DIO2-001	ALYDSVILL	DIO2

Tabla 1d: Péptidos de MHC de clase II de la invención

SEQ ID N.º:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
76	MMP12-002	INNYTPDMNREDVDYAIR	MMP12
77	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	POSTN

Tabla 1e: Otros péptidos preferidos de la presente invención que abundan en otros tipos de cáncer

SEQ ID N.º:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
78	SLI-001	SLYDNQITTV	SLIT1, SLIT2
79	TLX3-001	SLAPAGVIRV	TLX3
80	CEP192-001	SLFGNSGILENV	CEP192
81	ANKS1A-001	ALYGRLEVV	ANKS1A
82	CEP250-002	ALWEKNTHL	CEP250
83	MDN1-001	ALANQKLYSV	MDN1
84	OLFM1-001	ILMGTELTQV	OLFM1
92	NEFH-001	HLLEDIAHV	NEFH

Tabla 1f: Otros péptidos de la presente invención que abundan en otros tipos de cáncer

SEQ ID N.º:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
85	BUB1B-001	KIVDFSYSV	BUB1B
86	PI4KA-001	AMATESILHFA	PI4KA
87	AURKB-001	RVLPPSALQSV	AURKB
88	SLC3A2-001	SLLESNKDLLL	SLC3A2
89	IFT81-001	ALASVIKEL	IFT81
90	COG4-001	SLVAVELEKV	COG4
91	NCBP1-001	AMFENFVSV	NCBP1

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

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conformes a la presente invención en que dichos péptidos consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conformes a la presente invención en que dicho péptido está modificado y/o incluye enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conformes a la presente invención, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, en concreto fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (Ii)asociada al antígeno HLA-DR, o fusionado con un anticuerpo (o integrado en la secuencia del mismo), 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 conformes a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico conforme a la presente invención que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos.

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 conforme a la presente invención, a un ácido nucleico conforme a la presente invención o a un vector de expresión conforme a la presente invención para el uso en medicina.

La presente invención se refiere, además, a anticuerpos conformes a la presente invención y a métodos para fabricarlos.

La presente invención se refiere, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en concreto TCR solubles (sTCR), conformes a la presente invención, así como a métodos para fabricarlos.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico conforme a la presente invención o a un vector de expresión como el descrito antes.

La presente invención se refiere, además, a la célula hospedadora conforme a la presente invención que es una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, a la célula hospedadora conforme a la presente invención en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

La presente invención se refiere, además, a un método para la producción de un péptido conforme a la presente invención, comprendiendo dicho método el cultivo de la célula

hospedadora conforme a la presente invención, y el aislamiento del péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere, además, a un método *in vitro* para la producción de linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, comprendiendo el método la puesta en contacto *in vitro* de CTL con moléculas MHC de clase I o II humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante el tiempo suficiente para activar dicho CTL de una manera específica del antígeno, siendo dicho antígeno cualquier péptido conforme a la presente invención.

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

La presente invención se refiere, además, al método conforme a la presente invención en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido, el cual contiene las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, producidos con el método conforme a la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa de forma aberrante 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 dimensión, conteniendo el método de administración al paciente un número eficaz de linfocitos T citotóxicos (CTL) 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 dicho medicamento es una vacuna.

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 dichas células cancerosas son células de cáncer de pulmón, gástrico, gastrointestinal, colorrectal, de páncreas o de riñón, así como células de glioblastoma.

La presente invención se refiere, además, a proteínas marcadoras y biomarcadores concretos basados en los péptidos conformes a la presente invención que pueden ser

utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer de pulmón, gástrico, gastrointestinal, colorrectal, de páncreas o de riñón, así como el glioblastoma.

Además, la presente invención se refiere al uso de estas nuevas dianas para el tratamiento del cáncer.

La estimulación de la 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 tumor brinda la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para contrarrestar el crecimiento tumoral. En la actualidad se están estudiando varios mecanismos para aprovechar los componentes humoral y celular del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Elementos específicos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer y destruir específicamente las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) a partir de poblaciones de células infiltradas en el tumor o de la sangre periférica apunta a su importante papel en la defensa inmunitaria natural contra el cáncer. En concreto, en dicha respuesta desempeñan un papel importante los linfocitos T CD8-positivos, los cuales reconocen péptidos incorporados en las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que normalmente están compuestos por 8 a 10 residuos de aminoácidos procedentes de proteínas o productos ribosómicos defectuosos (DRIP) localizados en el citosol. Las moléculas MHC humanas también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: Las moléculas MHC de clase I están presentes en la mayoría de las células nucleadas. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores de MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores de MHC de clase II). La conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las MHC de clase I presentan péptidos derivados de la proteólisis de proteínas principalmente endógenas, DRIP y péptidos grandes. Las moléculas MHC de clase II se encuentran principalmente en células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, donde básicamente presentan péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son adquiridos por las APC durante el proceso de endocitosis y después procesados. Los complejos formados por un péptido y moléculas MHC de clase I son reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD8-positivos portadores del adecuado TCR (receptor de linfocito T), mientras que los complejos formados por un péptido y moléculas MHC de clase II son reconocidos por linfocitos T colaboradores CD4-positivos portadores del TCR adecuado. Es sabido que los TCR, los péptidos y las MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T colaboradores 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 epítopos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) que sean reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos reviste suma importancia para el desarrollo de medicamentos que estimulen una respuesta inmunitaria antitumoral (Kobayashi et al., 2002; Qin et al., 2003; Gnjatic et al., 2003).Los linfocitos T colaboradores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los CTL (Mortara et al., 2006) y que atrae a las células

efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos, granulocitos (Hwang et al., 2007).

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

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores sin el concurso de las células efectoras CTL (los linfocitos T CD8-positivos) a través de la inhibición de la angiogénesis mediante la secreción de interferón gamma (IFN-γ).

Además se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden contrarrestar la progresión tumoral mediante la inducción de respuestas de anticuerpos al reconocer péptidos de antígenos asociados a tumor presentados por moléculas HLA de clase II.

A diferencia de lo que sucede con los péptidos asociados a tumor reconocidos por moléculas HLA de clase I, hasta la fecha el número descrito de ligandos de clase II derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) es pequeño.

Puesto que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II solo se da normalmente en las células inmunitarias, se creía imposible aislar péptidos de clase II directamente de los tumores primarios. Pero Dengjel et al. descubrieron varios epítopos de MHC de clase II en tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1; (Dengjel et al., 2006).

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos de tumor, es decir, sus epítopos, pueden ser moléculas derivadas de cualquier clase de proteína, como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que se expresan y, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están reguladas al alza en células del tumor correspondiente.

Como ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen de modo conjunto y sinérgico al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor que son reconocidos por los CTL CD8+ (ligando: molécula MHC de clase I + epítopo peptídico) o por los linfocitos T colaboradores CD4-positivos (ligando: molécula MHC de clase II + epítopo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales.

La presente invención también se refiere a dos nuevos y sumamente útiles péptidos MHC de clase II (conforme a las SEQ ID N.º 76 y 77). Estos péptidos son especialmente útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer gástrico, el NSCLC y otros tipos de cáncer que sobreexpresan y/o presentan en exceso la MMP12 y el POSTN, respectivamente.

La presente invención también se refiere a las denominadas variantes de longitud de los péptidos MHC de clase II de la invención conformes a las SEQ ID N.º 76 o 77. Tal y

como se ha mencionado antes, el péptido conforme a la SEQ ID N.º 76 consiste en la secuencia de aminoácidos INNYTPDMNREDVDYAIR (péptido de MMP12), y el péptido conforme a la SEQ ID Nº 77 consiste en la secuencia de aminoácidos TNGVIHVVDKLLYPADT (péptido de POSTN-002). Las variantes de longitud son, en general, péptidos alargados por los extremos N- y/o C-terminal (entre 1 y 5, preferiblemente 1 a 10 aminoácidos) o acortados por los extremos N- y/o C-terminales (entre 1 y 5 aminoácidos), que pueden unirse a MHC y desencadenar una respuesta inmunitaria celular como se describe en la presente memoria. Es conocido en la técnica que los péptidos que se unen a proteínas de clase II no tienen limitaciones de tamaño y su longitud puede variar entre 11 y 30 aminoácidos. La hendidura de unión al péptido de las moléculas MHC de clase II está abierta por ambos extremos, lo que permite la unión de péptidos relativamente largos. Aunque el segmento «central» de nueve residuos de longitud es el principal implicado en el reconocimiento del péptido, las regiones situadas a ambos lados también son importantes para definir la especificidad del péptido con el alelo de clase II (véase, por ejemplo, Meydan C, et al., Prediction of peptides binding to MHC class I and II alleles by temporal motif mining. BMC Bioinformatics. 2013;14 Suppl 2:S13. Epub 2013 Jan 21). Por medio de las numerosas herramientas informáticas disponibles, como las susodichas, la persona versada en la técnica podrá identificar el motivo de unión y determinar así las posibilidades de extensión y/o deleción de los péptidos MHC de clase II conforme a las SEQ ID N.º 76 o 77, con el fin de crear variantes de longitud.

Para que un péptido desencadene una respuesta inmunitaria celular debe unirse a una molécula MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos de unión a MHC de clase I suelen tener de 8 a 12 residuos de aminoácido de longitud y normalmente contienen en su secuencia dos residuos conservados («anclajes») que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula 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.

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos de tumor, esto es, sus epítopos, pueden ser moléculas derivadas de cualquier clase de proteína, como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que se expresan y, en comparación con las células inalteradas del mismo origen, están reguladas al alza en células del tumor correspondiente.

La clasificación actual de los antígenos asociados a tumor 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 está presentes tanto en los tumores como en el tejido normal del que deriva el tumor; la mayoría se encuentran en melanomas y en melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son la tirosinasa y Melan-A/MART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.
c) TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente distintos y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítopos 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.
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 epítopos nuevos en tumores como MUC1 o fenómenos como el ayuste de proteínas durante la degradación que en algunos casos pueden ser específicos de tumor.
f) Proteínas de oncovirus: Estos TAA son proteínas virales que podrían desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y que, como extrañas a causa de su origen no humano, pueden desencadenar una respuesta de los linfocitos T. Ejemplos de tales proteínas son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se expresan en el carcinoma cervical.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser utilizadas como tratamiento han de cumplir ciertos requisitos. El antígeno ha de expresarse principalmente en células tumorales y no en tejidos normales sanos, o de no ser así ha de hacerlo en cantidades comparativamente pequeñas; en otra forma de realización preferida el péptido debe ser presentado en exceso por células tumorales en comparación con los tejidos normales sanos. Además, no solo es conveniente que el antígeno esté presente en un tipo de tumor, sino que lo esté en concentraciones elevadas (número de copias del correspondiente péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y los asociados a tumor proceden con frecuencia de proteínas que intervienen directamente en la transformación de la célula normal en tumoral debido a su función en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, las dianas posteriores de las

proteínas directamente responsables de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por ende, estar vinculadas indirectamente con el tumor. Tales antígenos asociados indirectamente al tumor también pueden ser dianas de las vacunas antitumorales (Singh-Jasuja et al., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítopos para que ese péptido («péptido inmunógeno») derivado de un antígeno asociado a tumor desencadene la respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente cualquier péptido capaz de unirse a una molécula MHC puede actuar como un epítopo de linfocito T. Un requisito para la inducción de la respuesta de los linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de linfocitos T dotados de un TCR adecuado y la ausencia de inmunotolerancia hacia ese epítopo concreto.

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos de identificación y caracterización de los TAA están basados en el uso de CTL que pueden ser aislados de pacientes o de sujetos sanos, o bien están basados en la generación de perfiles de transcripción o patrones de expresión peptídica que difieren entre los tumores y los tejidos normales.

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítopo concreto ha de ser mínima o nula. En una forma de realización muy preferida de la invención es importante por tanto 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. Ese linfocito T funcional se define como todo linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico experimenta expansión clonal y es capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

En el caso de los TCR y de los anticuerpos conformes a la invención la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En los TCR y en los anticuerpos de la invención la presentación es el factor determinante.

Los linfocitos T colaboradores desempeñan un papel importante en la organización de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos de linfocito T colaborador que desencadenan la respuesta de los linfocitos T colaboradores de tipo T_{H1} sustentan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos, que incluyen funciones citotóxicas contra las células tumorales que exhiben en su superficie complejos de péptido asociado a tumor/MHC. De ese modo los epítopos peptídicos asociados a tumor de los linfocitos T colaboradores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumor, pueden servir como principios activos farmacéuticos de composiciones vacunales que estimulan respuestas inmunitarias antitumorales.

En la siguiente descripción de las proteínas de los péptidos conforme a la invención se dan a conocer diversas utilizaciones contra otros tipos de cáncer.

Casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 13 (ABCA13)

La familia de transportadores transmembrana con casete de unión a ATP (ABC) cuenta en el ser humano con al menos 48 genes y 7 subfamilias de genes. La proteína predicha ABCA13 consiste en 5058 residuos de aminoácidos, lo que la convierte en la mayor proteína ABC descrita hasta la fecha (Prades et al., 2002). Knight et al. confirmaron que la proteína ABCA13 se expresa en la corteza y en el hipocampo del ratón y del hombre, regiones relevantes en la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Knight et al., 2009). El gen ABCA13 está localizado en el cromosoma 7p12.3, una región que alberga un trastorno pancreático hereditario (síndrome de Shwachman-Diamond) así como un locus implicado en la invasión del tumor por linfocitos T y en la metástasis (INM7), lo que lo convierte en un candidato posicional para esas enfermedades (Prades et al., 2002).

Metalopeptidasa de la matriz 12 (elastasa de macrófagos) (MMP12)

La MMP12, también llamada metaloelastasa humana (HME) o metaloelastasa de macrófago (MME) es una endopeptidasa de zinc reconocida por su capacidad para degradar la elastina. Aparte de lo anterior, posee una amplia gama de sustratos que engloba otras proteínas de la matriz como colágeno, fibronectina, laminina o proteoglicanos, y otras ajenas a la misma como la alfa-1-antitripsina. La MMP12 podría contribuir a la destrucción de los alveolos y a la remodelación de las vías respiratorias en el asma, el enfisema y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Cataldo et al., 2003; Wallace et al., 2008). También ha sido implicada en la migración de los macrófagos, ya que puede convertir el plasminógeno en angiostatina y contribuir así a la inhibición de la angiogénesis (Chakraborti et al., 2003; Chandler et al., 1996; Sang, 1998). A semejanza de otras metaloproteinasas la MMP12 interviene en procesos fisiológicos como la embriogénesis, la cicatrización de heridas y el ciclo menstrual (Chakraborti et al., 2003; Labied et al., 2009), así como en procesos patológicos de destrucción de tejidos.

Aunque en varios casos los datos proceden de un pequeño número de pacientes, la bibliografía contiene numerosas pruebas de que la MMP12 aparece sobreexpresada a menudo en el cáncer (Denys et al., 2004; Hagemann et al., 2001; Ma et al., 2009; Vazquez-Ortiz et al., 2005; Ye et al., 2008). Con todo, la repercusión de la sobreexpresión de la MMP-12 en los parámetros y el pronóstico clínicos es objeto de controversia. Tal vez intervenga en la disolución de la matriz, y por tanto en la metástasis, pero también podría inhibir el crecimiento tumoral con la producción de angiostatina, proceso que influye negativamente en la angiogénesis (Gorrin-Rivas et al., 2000; Gorrin Rivas et al., 1998; Kim et al., 2004).

En el cáncer de pulmón, las consecuencias de la expresión de la MMP12 son igualmente controvertidas. La sobreexpresión de la MMP12 en las células epiteliales ha sido descrita en la remodelación del pulmón provocada por la inflamación. La regulación al alza de la MMP12 podría estar involucrada en la transformación del enfisema en cáncer de pulmón (Qu et al., 2009). Los estudios en animales sugieren que la expresión de la MMP12 en las células estromales o en los macrófagos suprime el crecimiento de los tumores pulmonares (Acuff et al., 2006; Houghton et al., 2006). No obstante, también se ha descrito que la sobreexpresión de la MMP12 en tumores pulmonares está correlacionada con recidiva, metastatización y una supervivencia sin progresión más breve tras la resección quirúrgica (Cho et al., 2004; Hofmann et al., 2005).

Distonina (DST)

El gen DST (BPAG1-e) codifica un miembro de la familia de proteínas de la plakina, proteínas de la placa de adhesión. La BPAG1-e se expresa en el tejido epitelial, donde ancla los filamentos intermedios de queratina a los hemidesmosomas (HD). Los hemidesmosomas son complejos de adhesión multiproteínicos que promueven la fijación estroma-epitelio en los epitelios estratificados y complejos. La modulación de su función es primordial en diversos procesos biológicos como la diferenciación y la migración de los queratinocitos durante la cicatrización de heridas y la invasión de los carcinomas, en que las células se desprenden del sustrato y adquieren un fenotipo móvil (Litjens et al., 2006).

El melanoma maligno es uno de los tipos de tumor más agresivos. La BPAG1 se expresa en estirpes celulares del melanoma humano (A375 y G361) y en melanocitos humanos normales. Las concentraciones de autoanticuerpos anti-BPAG1 en el suero de pacientes con melanoma resultan notablemente mayores que en el suero de voluntarios sanos ($p<0,01$). Los autoanticuerpos anti-BPAG1 podrían ser un buen marcador para el diagnóstico del melanoma (Shimbo et al., 2010). La DST ha aparecido asociada con la invasión del cáncer de mama (Schuetz et al., 2006). El gen BPAG1 probablemente intervenga en la proliferación, la apoptosis, la invasión y la metástasis del carcinoma nasofaríngeo (NPC) (Fang et al., 2005).

Asociado a remodelación de la matriz 5 (MXRA5)

El MXRA5, también llamado adlicano, codifica un proteoglicano de adhesión y pertenece a un grupo de genes involucrado en la remodelación de la matriz extracelular y en la adhesión entre células (Rodningen et al., 2008). Pese a que la función del MXRA5 en el cáncer se desconoce, se han identificado mutaciones somáticas del mismo en tumores procedentes de tejidos diversos como piel, cerebro, pulmón y ovario. El análisis por RT-PCR del adlicán (MXRA5) ha confirmado los hallazgos con micromatrices referentes a su sobreexpresión en tumores de colon respecto al tejido colónico normal (13 tumores colorrectales y 13 tejidos normales) (Zou et al., 2002). En un estudio reciente el gen asociado a remodelación de la matriz 5 fue el segundo mutado con más frecuencia en el NSCLC (el primero fue el TP53) (Xiong et al., 2012).

Cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) / Cinasa dependiente de ciclina 6 (CDK6)

La CDK4 es un miembro de la familia de las proteína-cinasas de Ser/Thr. Es una subunidad catalítica del complejo proteína-cinasa que es importante para la progresión de la fase G1 del ciclo celular. La actividad de esta cinasa está limitada a la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y el control de su expresión es principalmente transcripcional (Xiao et al., 2007). Las enzimas CDK4 y CDK6 y sus reguladores, p. ej. las ciclinas, desempeñan cometidos esenciales en la embriogénesis, la homeostasia y la oncogénesis (Graf et al., 2010).

La expresión de la proteína CDK4 en tejidos de cáncer de pulmón ha resultado notablemente mayor que en tejidos normales ($P < 0,001$). Los pacientes con una expresión elevada de la CDK4 presentan un tiempo de supervivencia notablemente más breve que los pacientes con una baja expresión. El análisis multivariable apunta a que el grado de expresión de la CDK4 es un indicador pronóstico independiente ($P < 0,001$) de la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón. Asimismo, la supresión de la expresión de la CDK4 también elevó significativamente la expresión del regulador del ciclo celular p21 (Wu et al., 2011a). En las células pulmonares que expresan el oncogen endógeno K-Ras, la anulación de la Cdk4 provoca una respuesta de senescencia

inmediata, a diferencia de lo que sucede con la Cdk2 y la Cdk6. Esa respuesta no se observa en los pulmones que expresan un solo alelo Cdk4 ni en otros tejidos que expresan K-Ras. Cuando se toman como objetivo los alelos de la Cdk4 en tumores avanzados detectables por tomografía computarizada también se provoca la senescencia y se evita la progresión del tumor (Puyol et al., 2010).

Ribonucleoproteína heterogénea nuclear H1 (H) (HNRNPH1) /
Ribonucleoproteína heterogénea nuclear H2 (H') (HNRNPH2)
Ambos genes pertenecen a la subfamilia de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) cuya expresión es ubicua. Las hnRNP son proteínas de unión a ARN que forman complejos con el ARN heterogéneo nuclear (ARNhn). Estas proteínas están asociadas con el pre-ARNm en el núcleo y parecen influir en su procesamiento así como en otros aspectos del metabolismo y del transporte del ARNm.

La actividad de las hnRNP H parece estar implicada en la patogenia y en la progresión de los gliomas malignos como el centro de un cambio oncógeno en el ayuste, que podría reflejar la reactivación de los patrones de célula totipotente y mediar múltiples aspectos clave de la malignidad del tumor, incluida la evasión de la apoptosis y la invasividad (Lefave et al., 2011). La reducción de la expresión de la hnRNP H o de A-Raf mediante ARN pequeños de interferencia provoca la apoptosis dependiente de MST2. En cambio, la expresión forzada de la hnRNP H o de A-Raf contrarrestó en parte la apoptosis inducida por etopósido (Rauch et al., 2010). La regulación al alza de las hnRNP H/H' se constata en un limitado número de tejidos que normalmente expresan bajos niveles citoplasmáticos de hnRNP H/H', por ejemplo, el adenocarcinoma pancreático, el carcinoma hepatocelular y el carcinoma gástrico (Honore et al., 2004).

Repetición de tetratricopéptido, repetición de anquirina y espiral enrollada 2 (TANC2)
La familia TANC comprende TANC1 y TANC2, que fueron descubiertos en 2005 (Han et al., 2010). Las proteínas de la familia TANC intervienen en la regulación de las espinas dendríticas, el aprendizaje espacial y el desarrollo embrionario, puesto que la deficiencia de TANC1 en ratones reduce la densidad de espinas en el hipocampo y afecta al aprendizaje espacial, mientras que la deficiencia de TANC2 causa muerte embrionaria. Por el contrario, la sobreexpresión de TANC1 y TANC2 en neuronas cultivadas aumenta la densidad de las espinas dendríticas y las sinapsis excitadoras. Las proteínas TANC1 y 2 se expresan principalmente en el cerebro, órgano en el cual una proporción significativa se localiza en las membranas de vesículas pequeñas (Han et al., 2010).

Proteína con dedo RING 213 (RNF213)
La RNF213 codifica una proteína portadora de un dominio de dedo RING de tipo C3HC4, un tipo especializado de dedo de cinc que contiene dos átomos de este metal y que se cree que está implicada en la mediación de interacciones entre proteínas.

Un grupo de investigación ha aportado por primera vez indicios de la implicación de la RNF213 en la predisposición genética a la enfermedad de moyamoya (Liu et al., 2011b). Otro estudio ha demostrado que el gen RNF213 está relacionado con la predisposición a dicha enfermedad en la etnia china Han (Wu et al., 2012).

Familia de transportador soluble 34 (fosfato sódico), miembro 2 (SLC34A2)

SLC34A2 es un transportador de fosfato dependiente de sodio y sensible al pH. La regulación al alza de la expresión del gen SLC34A2 en tumores diferenciados podría reflejar procesos de diferenciación celular durante la oncogénesis ovárica, lo que podría convertirlo en marcador para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de ovario (Shyian et al., 2011). La RT-PCR confirma la expresión elevada de SLC34A2 en el cáncer papilar de tiroides (Kim et al., 2010b). También se ha constatado un aumento significativo de la expresión del gen SLC34A2 en tejidos de cáncer de mama respecto a tejidos normales (Chen et al., 2010a).

Portador de dominio SET y MYND 3 (SMYD3)

Se ha descrito con anterioridad que la regulación al alza de SMYD3, una metiltransferasa específica de la lisina 4 en la histona H3, desempeña un papel clave en la proliferación del carcinoma colorrectal (CCR) y del carcinoma hepatocelular (CHC). En otro estudio revelaron que la expresión de la SMYD3 también es elevada en la gran mayoría de tejidos de cáncer de mama. A semejanza de lo que sucede con el CCR y el CHC, el silenciamiento del gen SMYD3 con ARN pequeños de interferencia inhibió el crecimiento de células de cáncer de mama, lo que apunta a que un aumento de su expresión también sería esencial para la proliferación de dichas células (Hamamoto et al., 2006). La reducción de la expresión de SMYD3 por ARN de interferencia regula a la baja la expresión de c-Met e inhibe la migración y la invasión celulares inducidas por HGF (Zou et al., 2009). La SMYD3 cumple funciones cruciales en la proliferación y la invasión/migración de las células HeLa y podría servir como diana terapéutica en los carcinomas de cuello uterino humanos (Wang et al., 2008b).

Familia de la aldo-ceto-reductasa 1, miembro C1 (AKR1C1) / Familia de la aldo-ceto-reductasa 1, miembro C2 (AKR1C2)

AKR1C1 y AKR1C2 solo difieren en siete residuos de aminoácidos (Le et al., 2010). Ambas regulan la actividad de los andrógenos, los estrógenos y la progesterona, así como la ocupación y la transactivación de los respectivos receptores (Penning et al., 2000; Steckelbroeck et al., 2004). Las enzimas AKR1C, excepto AKR1C4 que es específica del hígado, aparecen expresadas en diversos tejidos normales y patológicos por lo que se han vinculado con diversas enfermedades como el cáncer de pulmón, mama, próstata, endometrio, la leucemia mieloide, y otras (Brozic et al., 2011; Byrns et al., 2011). La sensibilidad al cisplatino parece estar asociada con los niveles de AKR1C en estirpes celulares de cáncer de pulmón epitelial (Chen et al., 2010b) y en pacientes con NSCLC (Kuang et al., 2012; Stewart, 2010). Así pues, la sobreexpresión de la AKR1C es un indicador de pronóstico malo y de quimiorresistencia en el cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC) (Wang et al., 2007). La sobreexpresión de la AKR1C2 también está vinculada con la progresión de la enfermedad en el cáncer de próstata (Huang et al., 2010). La reducción de la expresión de AKR1C2 con ARNi inhibe la carcinogénesis *in vivo* e *in vitro*, lo que apunta claramente a que los ARNsi dirigidos contra la AKR1C2 podrían desempeñar un papel crucial en el bloqueo de la hepatocarcinogénesis (Dong-Dong, 2007).

Reticulocalbina 1, dominio de unión a calcio de tipo mano EF (RCN1) / reticulocalbina 3, dominio de unión a calcio de tipo mano EF (RCN3)

La reticulocalbina 1 es una proteína de unión a calcio localizada en el lumen del retículo endoplasmático. Los análisis inmunohistoquímicos han demostrado la amplia distribución de las RCN en varios órganos fetales y adultos, principalmente en los órganos endocrinos y exocrinos. La sobreexpresión de las RCN podría intervenir en

procesos relacionados con la oncogénesis, la invasión tumoral y la farmacorresistencia (Fukuda et al., 2007). La reticulocalbina 1 (RCN1) es una proteína de la superficie celular presente en estirpes celulares de cáncer endotelial y cáncer de próstata. La expresión de la RCN1 en la superficie celular apareció regulada al alza en células endoteliales de médula ósea que habían sido tratadas con factor de necrosis tumoral alfa (Cooper et al., 2008). La RCN1 está regulada al alza en el carcinoma colorrectal (CCR) y ha sido localizada en células cancerosas y en células estromales cercanas a ellas. Podría ser un nuevo candidato a marcador del CCR (Watanabe et al., 2008). La RCN3 pertenece a la familia CREC (Cab45/reticulocalbina/ERC45/calumenina), integrada por proteínas de unión a Ca^{2+} portadoras de múltiples manos EF que están localizadas en la vía secretora (Tsuji et al., 2006). Se ha sugerido que la RCN3 podría ser un gen candidato importante en los oligodendrogliomas, pero se sabe muy poco sobre su función (Drucker et al., 2009).

Interleucina 8 (IL-8)

La IL-8 es una quimiocina de la familia CXC que constituye uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria. Segregada por varios tipos de células, actúa como quimiotáctica y como un potente factor angiogénico. Las quimiocinas CXC (ELR+) como la IL-8 promueven la angiogénesis y podrían ser importantes en los tipos de cáncer de fenotipo angiogénico como el NSCLC (Arenberg et al., 1997). Hace poco se ha descubierto que la IL-8 de origen tumoral atrae a las células tumorales circulantes para que regresen al tumor inicial (en cáncer de mama, cáncer de colon y melanoma), generando un fenotipo tumoral más agresivo (Kim et al., 2009). Las concentraciones de IL-8 están asociadas con el riesgo de cáncer de pulmón varios años antes del diagnóstico. La IL-8 junto con la CRP constituye la combinación de biomarcadores más robusta para la predicción del cáncer de pulmón (Pine et al., 2011). Las mutaciones activadoras de KRAS y EGFR regulan al alza la expresión de la IL-8 en el NSCLC; la IL-8 se expresa mucho en los NSCLC de pacientes varones, fumadores y ancianos, el NSCLC con afectación pleural, y los adenocarcinomas con KRAS mutado; y, por último, la IL-8 interviene en el crecimiento y la migración celular en el NSCLC impulsado por el oncogén KRAS (Sunaga et al., 2012).

Receptor pirimidinérgico P2Y, acoplado a proteína G, 6 (P2RY6)

P2RY6 pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G. La familia la componen varios subtipos de receptores de los nucleótidos adenosina y uridina dotados de diferente selectividad farmacológica, en ciertos casos solapada. El subtipo P2Y6 alcanza una expresión especialmente alta en la placenta, señal de una función importante en dicho órgano, aunque se desconoce su localización celular en la placenta. La P2Y6 podría desempeñar una importante función en el desarrollo, la diferenciación y la neoplasia trofoblástica (Somers et al., 1999). Se ha descrito un cometido importante del receptor P2Y activado por pirimidinas en la respuesta inflamatoria del epitelio pulmonar (Schafer et al., 2003).

Ligasa de ubiquitina E3, con dominios HECT, UBA y WWE, tipo 1 (HUWE1)

El HUWE1 codifica un miembro de la familia de la ligasa de ubiquitina de tipo E3 con HECT. El dominio HECT está situado en el extremo C-terminal y contiene la cisteína del sitio activo que forma el enlace tioéster intermediario con la ubiquitina.

La ARF-BP1 (HUWE1) es un mediador crítico de las funciones oncosupresoras de ARF, tanto de la dependiente como de la independiente de p53. Como tal, ARF-BP1 podría servir como diana terapéutica antitumoral, sin necesidad de tener en cuenta el

estado de p53 (Chen et al., 2005a). La inactivación de ARF-BP1 estabilizó la p53 y estimuló la apoptosis (Chen et al., 2006). HUWE1 (HectH9) se sobreexpresa en numerosos tumores humanos y es esencial para la proliferación de un subgrupo de células tumorales (Adhikary et al., 2005; Zhang et al., 2011a). En el cáncer de mama, HUWE1 aparece correlacionado de modo significativo con factores pronósticos relevantes así como con el desenlace clínico (Confalonieri et al., 2009).

Versicano (VCAN)
VCAN es un miembro de la familia de proteoglicanos agrecano/versicano. Se sabe que VCAN está relacionada con moléculas de la matriz extracelular como el hialuronano, tenascina, fibulina-1, fibronectina, CD44 y L-selectina, fibrilina, integrina y la proteína de enlace (*link protein*) (Zheng et al., 2004). VCAN se expresa en diferentes tejidos. Al inicio del desarrollo tisular se expresa mucho y después disminuye tras la maduración del tejido. La expresión también aparece elevada en la cicatrización de heridas y el crecimiento tumoral (Ghosh et al., 2010). La inactivación génica de VCAN por ARN de interferencia en células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) inhibió significativamente el crecimiento tumoral *in vivo* pero no *in vitro* (Creighton et al., 2005). VCAN es una diana directa de p53. También se ha hallado una expresión elevada en tejido estromal peritumoral de tumores prostáticos en fase inicial, así como en tumores de mama, y también se le ha relacionado con la malignidad del tumor (Yoon et al., 2002).

Drosha, ribonucleasa de tipo III (DROSHA)
Drosha es una enzima ARNasa III de clase 2 responsable de iniciar el procesamiento del microARN (ARNmi), o de moléculas cortas de ARN que la célula expresa de forma natural y que regulan una amplia gama de genes que interactúan con el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para inducir la degradación del ARN mensajero complementario (ARNm) como parte de la vía de los ARNi. La molécula de microARN es sintetizada en forma de un largo transcrito primario conocido como pri-ARNmi, que es procesada por Drosha para producir una estructura característica de horquilla con bucle de unos 70 pares de bases de longitud, conocida como pre-ARNmi (Lee et al., 2003). Drosha forma parte de un complejo proteínico llamado complejo microprocesador, que también contiene la proteína de unión a ARN bicatenario Pasha (también llamada DGCR8) (Denli et al., 2004), la cual resulta esencial para la actividad de Drosha y es capaz de unirse a fragmentos monocatenarios del pri-ARNmi que son necesarios para el procesamiento correcto (Han et al., 2006). La Drosha humana se clonó en 2000, cuando se la identificó como una ribonucleasa nuclear de ARNdc involucrada en el procesamiento de precursores del ARN ribosómico (Wu et al., 2000). Drosha fue la primera enzima ARNasa III humana descubierta y clonada. Las otras dos enzimas humanas que participan en el procesamiento y la actividad de los ARNmi son las proteínas Dicer y Argonaute. Tanto Drosha como Pasha están situadas en el núcleo celular, donde tiene lugar la transformación del pri-ARNmi en pre-ARNmi. A continuación esta última molécula es procesada por la ARNasa Dicer y convertida en ARNmi maduros en el citoplasma celular (Lee et al., 2003). Drosha y otras enzimas procesadoras del ARNmi podrían ser importantes en el pronóstico del cáncer (Slack and Weidhaas, 2008).

Portadora de dominio de homología con la pleckstrina, familia A (específico de unión a fosfoinositida) miembro 8 (PLEKHA8)

El gen del fosfatidilinositol-4-fosfato adaptador-2 (FAPP2 = PLEKHA8) codifica una transferasa citoplasmática de lípidos dotada de un dominio de homología con la pleckstrina que ha sido implicada en la maduración y el transporte de vesículas desde el trans-Golgi hasta la membrana plasmática (Cao et al., 2009). La introducción de ribozimas específicas contra el gen FAPP2 en células de carcinoma de colon indujo su apoptosis en presencia de anticuerpos agonistas de Fas. Asimismo, células de glioma y de tumor mamario transfectadas con ARNsi de FAPP2 manifestaron una creciente apoptosis (Tritz et al., 2009). Estudios posteriores han puesto de manifiesto la función de FAPP2 como proteína de transferencia de lípidos en el metabolismo de los glucoesfingolípidos en el aparato de Golgi (D'Angelo et al., 2012). La proteína 2 con adaptador de fosfoinositol-4-fosfato (FAPP2) desempeña un papel esencial en la síntesis de los glucoesfingolípidos (GSL) y emplea su dominio C-terminal para transportar la glucosilceramida recién sintetizada desde la glucosilceramida sintasa de la cara citosólica hasta el cis-Golgi donde se la somete a nuevas transformaciones anabólicas (Kamlekar et al., 2013).

Acetil-CoA-carboxilasa alfa (ACACA)

La ACACA es una enzima con biotina que cataliza la carboxilación del acetil-CoA en malonil-CoA, el paso limitante en la síntesis de los ácidos grasos (Tong and Harwood, Jr., 2006). La regulación al alza de la ACACA ha sido confirmada en numerosos tipos de cáncer humano, fenómeno que promueve la lipogénesis para satisfacer las necesidades de las células cancerosas cuyo rápido crecimiento y proliferación demanda. Ello convierte a la ACACA en una potencial diana para los tratamientos contra el cáncer, y abre la posibilidad de que los inhibidores desarrollados para el tratamiento de metabolopatías puedan servir como antitumorales (Wang et al., 2010a). Dos estudios han demostrado que el silenciamiento de la ACACA con ARN de interferencia inhibe el crecimiento e induce la muerte celular casi con la misma magnitud observada tras el silenciamiento de la expresión del gen FASN (Brusselmans et al., 2005; Chajes et al., 2006). El TOFA (ácido 5-tetradeciloxi-2-furoico), un inhibidor alostérico de la ACACA, es citotóxico para las células de cáncer de pulmón NCI-H460 y las células de carcinoma de colon HCT-8 y HCT-15 e induce la apoptosis (Wang et al., 2009a). Otro inhibidor muy potente de la ACACA, el sorafeno A, bloquea la lipogénesis y acelera la oxidación de los ácidos grasos en células de cáncer de próstata. Las células cancerosas detienen su proliferación y acaban muriendo (Beckers et al., 2007). Estos resultados parecen indicar que, aparte de la acumulación de malonil-CoA, la inhibición de la lipogénesis basta en sí misma para causar la muerte de las células tumorales, cosa que convertiría a la ACACA en una diana para los tratamientos antineoplásicos (Brusselmans et al., 2005).

Integrina, alfa 11 (ITGA11)

Las integrinas desempeñan cometidos esenciales en diversos procesos celulares y del desarrollo como el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las células, así como en la oncogénesis y la invasión y la metástasis de las células cancerosas. La integrina alfa 11 (ITGA11/alfa11) está localizada en los fibroblastos estromales y aparece sobreexpresada habitualmente en el carcinoma de pulmón amicrocítico (NSCLC). El ARNm de la alfa11 apareció sobreexpresado tanto en el adenocarcinoma de pulmón como en el carcinoma epidermoide (Wang et al., 2002). Se ha publicado que la alfa 11 desempeña un papel importante en la capacidad de los fibroblastos para estimular el crecimiento de las células NSCLC en condiciones *in vivo*, estando mediada en parte dicha actividad por su regulación de la expresión de IGF2 (Zhu et al., 2007). En

lo que concierne a las características clínico-patológicas de los pacientes con NSCLC, la sobreexpresión de hMTH1, SPD, HABP 2, ITGA11, COL11A1 y CK-19 apareció correlacionada de forma significativa con el estadio patológico ($p<0,05$). Asimismo, la sobreexpresión de hMTH1, SPD, ITGA11 y COL11A1 estuvo correlacionada con la metástasis ganglionar y el pronóstico malo (Chong et al., 2006).

Colágeno, tipo XII, alfa 1 (COL12A1)

El gen COL12A1 codifica la cadena alfa del colágeno de tipo XII, miembro de la familia de los colágenos FACIT (colágenos asociados a fibrillas con hélices triples interrumpidas). El colágeno de tipo XII es un homotrímero asociado con el colágeno de tipo I, asociación que supuestamente modifica las interacciones entre las fibrillas de colágeno I y la matriz circundante (Oh et al., 1992). El COL12A1 podría intervenir en la regulación de la membrana basal proporcionando puentes moleculares específicos entre las fibrillas y otros componentes de la matriz(Thierry et al., 2004). COL12A1 se expresa en el corazón, la placenta, el pulmón, el músculo estriado y el páncreas(Dharmavaram et al., 1998), así como en diversos tejidos conectivos como el cartílago articular y epifisario (Gregory et al., 2001; Walchli et al., 1994; Watt et al., 1992). El COL12A1 apareció regulado a la baja en tumores con alta inestabilidad de microsatélites en comparación con el grupo estable con baja o nula inestabilidad de microsatélites (Ortega et al., 2010).

Elastasa, expresada en neutrófilos (ELANE)

La elastasa neutrofílica (o elastasa leucocítica) también llamada ELA2 (elastasa 2, neutrófilo) es una proteinasa de serina dotada de amplia especificidad de sustrato perteneciente a la misma familia que la quimotripsina. Segregada por los neutrófilos durante la inflamación, destruye las bacterias y el tejido hospedador (Belaaouaj et al., 2000). La elastasa neutrofílica humana (ELANE) es uno de los principales actores en el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y ha sido implicada recientemente en la progresión del cáncer de pulmón amicrocítico. Puede actuar en diversos niveles: (i) intracelular, eliminando por ejemplo la molécula adaptadora llamada sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1); (ii) en la superficie celular, hidrolizando receptores como el CD40; (iii) en el espacio extracelular, generando fragmentos de elastina, es decir morfoelastocinas que podrían estimular la invasividad de las células cancerosas y la angiogénesis (Moroy et al., 2012). La elastasa neutrofílica estimuló directamente la proliferación de las células tumorales tanto en el adenocarcinoma de pulmón de ratón como humano al lograr introducirse a través de un compartimento endosómico en el interior de las células tumorales, donde degradó el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) (Houghton et al., 2010).

Inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 3 (SERPINB3)

El antígeno del carcinoma epidermoide (SCCA), también llamado SERPINB3, pertenece a la familia de los inhibidores de proteasas de serina de alto peso molecular (serpinas) (Suminami et al., 1991). Se han descrito niveles altos en el cáncer de cabeza y cuello y en otros tipos de cáncer epitelial (Torre, 1998). Se ha descrito la sobreexpresión de la SCCA en el tejido tumoral pero no en el tejido peritumoral, lo que apunta a su posible utilidad como marcador para la detección histológica del CHC (Pontisso et al., 2004). Las serpinas B3/B4, en especial la B4, parecen desempeñar un papel importante en la proliferación aberrante del epitelio. El análisis de las serpinas B3/B4 podría tener valor pronóstico en la predicción de la progresión tumoral, sobre todos en los pacientes con predisposición al cáncer de pulmón (Calabrese et al., 2012). Por un lado, la SCCA1

(SERPINB3) inhibe la muerte celular provocada por daños lisosómicos, mientras que por el otro sensibiliza las células frente a la respuesta de estrés del retículo endoplasmático activando la caspasa-8 independientemente de la vía apoptótica del receptor de muerte. Algunos hallazgos indican que la SERPINB3 juega un papel importante en la inducción de la alteración de la barrera epidérmica. La SERPINB3 podría influir de manera determinante en la función de barrera de la epidermis (Katagiri et al., 2010).

Familia de las cinesinas, miembro 26B (KIF26B)

La cinesina es una proteína perteneciente a una clase de proteínas motoras propias de las células eucariotas. Las cinesinas se desplazan a lo largo de los filamentos de microtúbulos, impulsadas por la hidrólisis de ATP; así pues, son ATPasas. El Kif26b, gen de la familia de las cinesinas, es una diana posterior de Sall1 (Nishinakamura et al., 2011). La Kif26b es esencial para el desarrollo del riñón porque regula la adhesión de las células mesenquimáticas en contacto con las yemas ureterales. La sobreexpresión de la Kif26b *in vitro* causó un aumento de la adhesión celular por interacciones con la miosina no muscular (Terabayashi et al., 2012; Uchiyama et al., 2010).

Anquilosis progresiva, homóloga (ratón) (ANKH)

La ANKH (homóloga humana de la anquilosis progresiva) regula el transporte del pirofosfato inorgánico (PPi) a través de la membrana celular (Wang et al., 2008a). Algunos datos sugieren que la expresión de ANKH y su función *in vitro* e *in vivo* quedan reprimidas en entornos hipóxicos y que el efecto está regulado por HIF-1 (Zaka et al., 2009). El gen de la ANKH humana aparece expresado *in vivo* en tejidos concretos, con los niveles más altos de ARNm en el cerebro, el corazón y el músculo estriado (Guo et al., 2001). Las mutaciones del gen ANKH se han vinculado con la displasia craneometafisaria autosómica dominante (Kornak et al., 2010). La ANKH apareció regulada al alza en estirpes celulares de cáncer de cuello uterino con amplificaciones en comparación con estirpes sin amplificaciones (Kloth et al., 2007). La amplificación genómica de regiones del brazo cromosómico 5p se ha observado con frecuencia en el cáncer de pulmón microcítico (SCLC), lo que implica la presencia de múltiples oncogenes en dicho brazo. Coe et al. describieron el descubrimiento de microdeleciones que habían eludido la detección por métodos convencionales y la identificación de TRIO y ANKH como nuevos oncogenes potenciales (Coe et al., 2005).

Factor exportador de ARN nuclear 1 (NXF1)

En las células humanas, el factor exportador de ARNm NXF1 reside en el nucleoplasma y en los complejos de los poros nucleares (Zhang et al., 2011b). El transporte del ARNm desde el sitio de transcripción en el núcleo hasta el sitio de traducción en el citoplasma es un proceso esencial para la expresión de los genes eucariotas. En las células humanas, el factor exportador de ARNm NXF1 (también llamado TAP) acompaña los transcritos de ARNm fuera del núcleo uniéndose simultáneamente al ARNm, a las proteínas adaptadoras del ARNm y a repeticiones de fenilalanina–glicina (FG) del complejo del poro nuclear (Kelly and Corbett, 2009). El NXF1 es singular entre los factores de transporte nucleares porque es una proteína multidominio que no guarda ninguna semejanza estructural ni mecanicista con las proteínas carioferinas que transportan cargas proteínicas, ARNt y microARN a través de los complejos del poro nuclear. La exportación de ARNm a cargo de NXF1 es un proceso independiente de la GTPasa Ran (Gruter et al., 1998). La exportación nuclear de RNPm está mediada por factores transportadores como el NXF1 que se une a RNPm y media su translocación a

través del canal central de los poros nucleares (NPC) mediante interacciones transitorias con nucleoporinas FG (Wickramasinghe et al., 2010). Los ARNm pueden ser transportados por vías de exportación masivas en las que interviene NXF1/TAP o por vías más especializadas en las que participa la proteína llamada de mantenimiento de la región cromosómica 1 (CRM1) (Siddiqui and Borden, 2012).

Regulador de la señalización con proteína G 4 (RGS4)

La RGS4 actúa como proteína aceleradora de GTPasas para modular la señalización de los receptores opioides μ y δ (MOR y DOR). La reducción de la RGS4 inducida por agonistas opioides ocurre a través de la vía de la ubiquitina-proteosoma y podría contribuir al mantenimiento de la homeostasis celular en el estado de morfinomanía (Wang and Traynor, 2011). La RGS4 desempeña un papel importante en la regulación de la función de las células beta (Ruiz, I et al., 2010). Xie et al. plantearon que la RGS4 sería un nuevo supresor de la migración y la invasión del cáncer de mama, pasos importantes en las cascadas metastásicas (Xie et al., 2009). La RGS4 aparece sobreexpresada en el carcinoma de tiroides. La regulación a la baja de su expresión en células de cáncer de tiroides redujo de manera significativa la viabilidad de dichas células, lo que apunta a su implicación significativa en la oncogénesis tiroidea (Nikolova et al., 2008). La RGS4 se expresó de forma diferencial en una estirpe de células de cáncer de páncreas humano y podría ser un gen marcador para la invasión local del tumor y las metástasis hepáticas del carcinoma pancreático (Niedergethmann et al., 2007). La sobreexpresión de RGS4 retrasó y alteró la tubulación en las células epiteliales pulmonares al inhibir selectivamente la activación de p38 MAPK mediada por proteína G y, por consiguiente, reduciendo la proliferación y la migración de las células epiteliales y la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Albig and Schiemann, 2005).

Glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (GFPT2)

La GFPT2 interviene en el crecimiento de las neuritas, el desarrollo inicial de las neuronas, la síntesis/señalización de los neuropéptidos y los receptores neuronales (Tondreau et al., 2008). Variantes génicas de la GFPT2 se han vinculado con la diabetes de tipo 2 y la nefropatía diabética (Zhang et al., 2004). Asimismo, el vínculo entre las SNP con la GFPT2 sugiere que el gen implicado en la modulación de la vía oxidativa podría ser un contribuyente importante en la insuficiencia renal crónica diabética (Prasad et al., 2010). La metilación del ADN del gen GFPT2 ha sido confirmada en muestras de leucemia linfoblástica aguda (ALL) primaria. Los pacientes que presentan metilación de múltiples islas CpG presentan peor supervivencia global (Kuang et al., 2008). La GFPT2 interviene en el metabolismo de la glutamina y se ha observado que se expresa más en estirpes de células mesenquimáticas. El metabolismo de la glutamina podría desempeñar un papel importante en la progresión tumoral y los inhibidores de las vías metabólicas celulares podrían constituir una forma de tratamiento epigenético (Simpson et al., 2012).

Molécula de adhesión de las células endoteliales cerebrales (CERCAM)

La CERCAM está ubicada en la superficie de las células endoteliales (Starzyk et al., 2000) y se la ha emplazado en el cromosoma 9q34. 11, una región candidata del 9q, vinculada con la escoliosis idiopática familiar (Miller et al., 2012). El gen CEECAM1 se transcribe ampliamente en el sistema nervioso y en varios tejidos secretores como las glándulas salivales, el páncreas, el hígado y la placenta (Schegg et al., 2009). La proteína CERCAM tiene una estructura similar a la de las enzimas ColGalT GLT25D1

y GLT25D2. Pero aunque su función se desconoce todavía, parece ser funcionalmente distinta de la proteína afín GLT25D1, y a diferencia de las proteínas GLT25D1 y GLT25D2 no actúa como glucosiltransferasa (Perrin-Tricaud et al., 2011).

UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminil-transferasa 2 (GalNAc-T2) (GALNT2)

La GALNT2 cataliza el primer paso de la O-glucosilación de tipo mucínico que sufren los péptidos en el aparato de Golgi. Estas enzimas transfieren N-acetilgalactosamina (GalNAc) desde la UDP-GalNAc al grupo hidroxilo de serinas o treoninas en las proteínas diana (Peng et al., 2010). La GALNT2 aparece expresada de forma constitutiva y en bajas concentraciones en la mayoría de estirpes celulares examinadas de adenocarcinoma humano de páncreas, colon, estómago y mama (Sutherlin et al., 1997). Los estudios han demostrado que los O-glucanos y los genes GALNT son esenciales en diversas funciones biológicas así como en el desarrollo de enfermedades humanas. Se han relacionado polimorfismos de un solo nucleótido de la GALNT2 con el riesgo de cáncer de ovario epitelial (Terry et al., 2010) y de angiopatía coronaria (Willer et al., 2008). La glucosilación aberrante de las glucoproteínas de la superficie celular provocada por alteraciones específicas de la actividad glucosiltransferasa suele estar asociada con la invasión y la metástasis del cáncer. La GALNT2 interviene en la migración y la invasión tumoral en los carcinomas gástricos (Hua et al., 2012), el carcinoma hepatocelular (CHC) (Wu et al., 2011b) y el glioma maligno humano (Liu et al., 2011a).

Ribonucleoproteína heterogénea nuclear M (HNRNPM)

El gen HNRNPM pertenece a la subfamilia de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP), cuya expresión es ubicua. La HNRNPM es un componente abundante de los complejos hnRNP humanos que puede influir en el proceso de corte y empalme del pre-ARNm regulando el ayuste de su propio pre-ARNm (Hase et al., 2006) o alterando la regulación del ayuste alternativo del receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2 (Hovhannisyan and Carstens, 2007). Los análisis proteómicos de spliceosomas purificados *in vitro* han detectado la HNRNPM en el complejo H pre-spliceosómico y a lo largo del ensamblaje del spliceosoma (Rappsilber et al., 2002; Wahl et al., 2009). La HNRNPM forma parte de la maquinaria del spliceosoma por su interacción con el subcomplejo CDC5L/PLRG1 del spliceosoma (Lleres et al., 2010). En células cancerosas humanas algunos resultados demuestran que la retención en el citoplasma de la IMP-3 y la HNRNPM provoca un descenso significativo de la proliferación. El complejo nuclear IMP-3-HNRNPM es importante para la síntesis eficiente de CCND1, D3 y G1 así como para la proliferación de las células cancerosas humanas (Rivera et al., 2013).

Basonuclina 1 (BNC1)

La basonuclina es una proteína con dedos de cinc que presenta una distribución tisular muy restringida (Tseng, 1998). Hasta el momento la basonuclina ha sido detectada principalmente en los queratinocitos basales de los epitelios escamosos estratificados (piel, epitelio bucal, esófago, vagina y córnea) y en células gametógenas del testículo y el ovario (Tseng and Green, 1994; Weiner and Green, 1998). Existen indicios considerables de que la basonuclina es un factor de transcripción de los genes del ARNr (ADNr) específico de ciertos tipos celulares. Los dedos de cinc de la basonuclina interaccionan con tres sitios evolutivamente conservados del promotor del ADNr (Iuchi and Green, 1999; Tseng et al., 1999). La regulación epigenética a través de la metilación

de CpG cumple un cometido importante en la oncogénesis así como en la respuesta al tratamiento oncológico. La BNC1 apareció hipometilada en estirpes de células humanas de cáncer de pulmón amicrocítico H1299 que son resistentes a la radioterapia. La supresión de la expresión del ARNm de la BNC1 en células H1299 también redujo la resistencia de estas células a las radiaciones ionizantes (Kim et al., 2010a). La metilación aberrante del ADN de BNC1 también se ha detectado en muestras de leucemia linfocítica crónica (LLC) (Tong et al., 2010). En el carcinoma de células renales (CCR), la metilación del BNC1 estuvo asociada con un peor pronóstico, independientemente del tamaño, el estadio o el grado del tumor (Morris et al., 2010).

Proteína de unión a FK506 10, 65 kDa (FKBP10)
La proteína de unión a FK506 10 (FKBP10) pertenece a la familia de las peptidil-prolil cis/trans isomerasas de tipo FKBP. Se localiza en el retículo endoplasmático y actúa como chaperona molecular (Ishikawa et al., 2008; Patterson et al., 2000). Se expresa mucho durante el desarrollo pulmonar y puede ser reactivada coordinadamente con proteínas de la matriz extracelular a causa de lesiones pulmonares (Patterson et al., 2005).

Receptor de la familia *Frizzled* 1 (FZD1), receptor de la familia *frizzled* 2 (FZD2), receptor de la familia *frizzled* 7 (FZD7)
Los genes FZD2, FZD1 y FZD7 pertenecen a la familia del gen *'frizzled'*; miembros de esta familia génica codifican proteínas con 7 dominios transmembrana que actúan como receptores de las proteínas de señalización Wnt.

La expresión del gen FZD2 parece estar regulada por el desarrollo, con altos niveles de expresión en el riñón y el pulmón del feto así como en el colon y en el ovario adultos (Sagara et al., 1998; Zhao et al., 1995).

La proteína FZD1 contiene un péptido señal, un dominio rico en cisteína en la región extracelular N-terminal, 7 dominios transmembrana y un motivo de unión a dominio PDZ en el extremo C-terminal. El transcrito de FZD1 se expresa en varios tejidos, entre ellos el pulmón, el corazón, riñón, páncreas, próstata y ovario (Sagara et al., 1998). La expresión de los receptores *frizzled* 1 y 2 se ha hallado regulada al alza en el cáncer de mama (Milovanovic et al., 2004).

La proteína FZD7 contiene una secuencia señal N-terminal, 10 residuos de cisteína típicos del dominio extracelular rico en cisteína de los miembros de la familia Fz, 7 posibles dominios transmembrana y una cola intracelular C-terminal con un motivo de unión a dominio PDZ. La expresión del gen FZD7 puede regular a la baja la función de las APC y potenciar las señales mediadas por la beta-catenina en los carcinomas de esófago humano poco diferenciados (Sagara et al., 1998; Tanaka et al., 1998).

ATPasa, transportadora de Ca++, miocardio, contracción rápida 1 (ATP2A1), ATPasa, transportadora de Ca++, miocardio, contracción rápida 2 (ATP2A2)
Ambos genes (ATP2A1 y ATP2A2) codifican Ca(2+)-ATPasas SERCA. Las ATPasas de calcio (SR)1/ER del retículo sarcoplasmático (SERCA) son bombas de calcio que acoplan la hidrólisis del ATP con el transporte del calcio a través de la membrana del retículo sarcoplasmático/retículo endoplasmático (MacLennan et al., 1997). Las SERCA son codificadas por tres genes homólogos: SERCA1 (ATP2A1), SERCA2 (ATP2A2) y SERCA3 (Wu et al., 1995). Han surgido a la luz indicios de que las SERCA podrían

influir directamente en el proceso de apoptosis, diferenciación y proliferación celular (Chami et al., 2000; Ma et al., 1999; Sakuntabhai et al., 1999).

Las mutaciones del gen ATP2A1, que codifica la SERCA1, causan algunas formas autosómicas recesivas de la enfermedad de Brody, una miopatía que se caracteriza por la alteración de la relajación muscular durante el esfuerzo (Odermatt et al., 1996).

La ATP2A2 es una ATPasa asociada a la enfermedad de Darier, un raro trastorno cutáneo hereditario y autosómico dominante que se caracteriza por queratinización anormal y acantólisis (Huo et al., 2010). Las alteraciones germinales de la ATP2A2 pueden predisponer al cáncer de pulmón y de colon y la alteración del gen ATP2A2 podría estar implicada en la carcinogénesis (Korosec et al., 2006). En una estirpe de células de cáncer de pulmón microcítico (H1339) y de adenocarcinoma de pulmón (HCC) el contenido de Ca2+ del retículo endoplasmático apareció reducido en comparación con el epitelio bronquial humano normal. El menor contenido de Ca2+ apareció relacionado con la menor expresión de la SERCA 2 que bombea calcio en el retículo endoplasmático (Bergner et al., 2009). Las ATP2A2 tal vez podrían servir como marcadores pronósticos para los pacientes con cáncer colorrectal (CCR). Se ha detectado en células tumorales circulantes (CTC), y la recidiva postoperatoria apareció correlacionada significativamente con la sobreexpresión del gen (Huang et al., 2012).

Laminina, gamma 2 (LAMC2)

Las lamininas, familia de glucoproteínas de la matriz extracelular, son las principales constituyentes de las membranas basales después de los distintos tipos de colágeno. Han sido implicadas en una gran diversidad de procesos biológicos como la adhesión, la diferenciación y la migración celulares, la señalización, el crecimiento de las neuritas y la metástasis. El gen LAMC2 codifica la cadena γ2 de la laminina 5, que forma parte de esta proteína, uno de los componentes principales de la zona de la membrana basal. La LAMC2 apareció con frecuencia regulada al alza por la desmetilación de su promotor en el cáncer gástrico (Kwon et al., 2011). La LAMC2 se ha hallado sobreexpresada en zonas de melanoma angiotrópico en comparación con zonas de melanoma avascular (Lugassy et al., 2009). La LAMC2 es un biomarcador de la metástasis del cáncer de vejiga, cuyo nivel de expresión apareció asociado con el grado del tumor (Smith et al., 2009b). Los genes LAMB3 y LAMC2 aparecieron coexpresados en 21 de 32 estirpes celulares de cáncer de pulmón amicrocítico (66%) pero solo en una de 13 estirpes celulares de cáncer de pulmón microcítico (8%). La coexpresión de los genes LAMB3 y LAMC2 también se ha observado en las células de cuatro casos de cáncer pulmón amicrocítico primario (todos los estudiados) pero no así en las correspondientes células de pulmón no cancerosas (Manda et al., 2000).

Proteína de choque térmico de 70 kDa número 2 (HSPA2), proteína de choque térmico de 70 kDa número 8 (HSPA8)

La HSPA2 ha sido identificada como posible proteína oncógena que se expresa en niveles anormales en un subgrupo de tumores humanos, como el cáncer de mama (Mestiri et al., 2001), cáncer de cuello de útero (Garg et al., 2010a), cáncer urotelial de vejiga (Garg et al., 2010b), carcinoma nasofaríngeo (Jalbout et al., 2003) y tumores malignos (Chouchane et al., 1997). En estirpes celulares procedentes de varios tipos de cáncer humano también se ha observado cierto grado de actividad del gen HSPA2 (Scieglinska et al., 2008), en tanto que su silenciamiento en células cancerosas detiene el crecimiento y disminuye el potencial oncógeno (Rohde et al., 2005; Xia et al., 2008).

Asimismo, el polimorfismo del gen HSPA2 aparece asociado con mayor riesgo de aparición del cáncer de pulmón (Wang et al., 2010b). La sobreexpresión del HSPA2 está correlacionada con el aumento de la proliferación celular, escasa diferenciación y metástasis ganglionares en el cáncer de mama, de cuello uterino y uroterial de vejiga humanos (Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b; Mestiri et al., 2001).
El gen HSPA8 codifica un miembro de la familia de las proteínas de choque térmico de 70 Hsc70, que contiene tanto miembros de expresión constitutiva como termoinducibles. La HSPA8 se une a los polipéptidos nacientes para facilitar el correcto plegamiento de las proteínas (Beckmann et al., 1990). Las Hsc70 actúan como chaperonas moleculares facilitando la síntesis, el plegamiento, el ensamblaje y el tránsito de las proteínas entre los compartimentos celulares, así como su degradación (Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). La Hsc70 se expresan tanto en células mamarias no malignas como en células de cáncer de mama (Kao et al., 2003; Vargas-Roig et al., 1998) y la sobreexpresión de Hsp/hsc70 en células cancerosas quimiorresistentes (Ciocca et al., 1992; Lazaris et al., 1997) ha propiciado estudios acerca del posible papel como marcador clínico de estas proteínas (Ciocca and Calderwood, 2005). Esta chaperona hsc70 segregada podría estar implicada en la proliferación celular que podría explicar el ritmo de crecimiento más acelerado de las células cancerosas que sobreexpresan la catepsina D (Nirde et al., 2010). Asimismo Ruisin et al. describieron la asociación entre un polimorfismo de este gen y el riesgo de cáncer de pulmón (Rusin et al., 2004).

Proteína vacuolar de clasificación 13 homólogo B (levadura) (VPS13B)
La VPS13B fue descubierta como una proteína de membrana periférica localizada en el aparato de Golgi, donde se solapa con la proteína de la matriz del cis-Golgi GM130. En consonancia con su localización en el interior de la célula, la eliminación de la VPS13B con ARNi provoca la fragmentación de la cinta del Golgi en diminutos dictiosomas (Seifert et al., 2011). Kolehmainen et al. (2003) descubrieron el gen COH1, también conocido como VPS13B, dentro de la región crítica del síndrome de Cohen en el cromosoma 8q22 (Kolehmainen et al., 2003). Las mutaciones que ocasionan la pérdida de la funcionalidad del gen VPS13B provocan el síndrome de Cohen, de carácter autosómico recesivo (Seifert et al., 2011). Las mutaciones del VPS13B y de otros genes se han descrito en diversos tipos de cáncer gástrico y colorrectal con inestabilidad de microsatélites (An et al., 2012).

Similar a la proteína de segregación cromosómica CSE1 1 (levadura) (CSE1L)
Se ha demostrado que el gen de sensibilidad a la apoptosis celular (CSE1L) regula múltiples mecanismos celulares como el punto de control del huso mitótico, así como la proliferación y la apoptosis. La CSE1L está localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. La CSE1L nuclear regula la actividad transcripcional de la proteína p53, una importante supresora de tumores (Rao et al., 2011; Tanaka et al., 2007). La CSE1L citoplasmática está asociada con los microtúbulos; se ha demostrado que esta asociación estimula la extensión de los invadopodios y promueve la migración de las células tumorales (Tai et al., 2010). La CSE1L presenta una elevada expresión en muchos tipos de cáncer, así como en lesiones melanocíticas benignas y malignas (Boni et al., 1999), carcinoma endometrial (Peiro et al., 2001), carcinoma ovárico (Brustmann, 2004), cáncer de mama (Behrens et al., 2001), carcinoma urotelial de vejiga (Chang et al., 2012), y se ha demostrado que su expresión está correlacionada con la progresión del cáncer. El silenciamiento de la CSE1L podría constituir una estrategia terapéutica contra el cáncer de colon (Zhu et al., 2013).

Similar a dihidropirimidinasa 4 (DPYSL4)
La proteína afín a la dihidropirimidinasa 4 (DPYSL4) es un conocido regulador del desarrollo de las neuronas del hipocampo. La DPYSL4 interviene en la regulación del crecimiento, la polarización y la diferenciación de las células epiteliales dentales durante la morfogénesis de los primordios dentales (Yasukawa et al., 2013). Algunos estudios han demostrado el papel de la DPYSL4 en la posible atenuación del crecimiento de las neuritas a través de la inhibición de la polimerización de los microtúbulos, y han revelado una desconocida asociación con la vimentina durante la condensación nuclear que precede a la muerte de la neurona (Aylsworth et al., 2009). El gen supresor de tumores p53, con frecuencia mutado en una amplia variedad de tumores, desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma. Agente antitumorales indujeron específicamente la síntesis del ARNm y la expresión de la proteína DPYSL4 en células competentes para p53. La DPYSL4 es un factor inducible por apoptosis, que está controlado por la p53 como respuesta a daños en el ADN (Kimura et al., 2011).

Subunidad gamma de Sec61 (SEC61G)
La SEC61γ es un componente del canal proteínico heterotrimérico que comprende las subunidades SEC61α, β y γ, y pertenece al translocón SEC61(Greenfield and High, 1999). El complejo SEC61 forma un poro transmembrana que permite el paso de los polipéptidos nacientes al lumen del retículo endoplasmático, así como la integración de las proteínas transmembrana en la bicapa de dicho orgánulo(Osborne et al., 2005). La SEC61γ es necesaria para la supervivencia de las células tumorales, así como para la respuesta celular frente al estrés del retículo endoplasmático. Aparece, además, notablemente sobreexpresada en células malignas y prácticamente ausente en células normales (Lu et al., 2009). La reducción de la expresión de SEC61γ provocó la apoptosis y la supresión de la vía de señalización de supervivencia EGFR/AKT (Lu et al., 2009), así como la inhibición del crecimiento de las células tumorales (Neidert et al., 2012).

Proteína similar a ORM1 1 (*S. cerevisiae*) (ORMDL1)
Los genes humanos (ORMDL1, ORMDL2 y ORMDL3) se expresan de forma ubicua en tejidos fetales y adultos. Codifican proteínas transmembrana ancladas en el retículo endoplasmático que probablemente intervienen en el plegamiento de proteínas en dicho orgánulo. A través del análisis de secuencias genómicas, Hjelmqvist et al. (2002) localizaron el gen ORMDL1 en el cromosoma 2q32. 2 (Hjelmqvist et al., 2002). Las proteínas ORMDL son las principales reguladoras de la biosíntesis de ceramida en las células de mamífero (Siow and Wattenberg, 2012). La ORMDL1 aparece específicamente regulada a la baja cuando la presenilina 1 (PS1) presenta mutaciones(Araki et al., 2008).

Proteína similar a pecanex 3 (*Drosophila*) (PCNXL3)
La proteína similar a pecanex 3 (PCNXL3) es una proteína transmembrana de paso múltiple perteneciente a la familia pecanex.
El gen PCNXL3 ha sido localizado en la región cromosómica 11q12. 1-q13. En la región del cromosoma 11q13 se localizaron tres nuevos puntos de translocación asociados a tumores humanos entre los marcadores D11S4933 y D11S546. El PCNXL3 podría ser un gen patológico asociado a la región 11q13 (van et al., 2000).

Ribonucleoproteína nuclear pequeña de 200 kDa (U5) (SNRNP200)
El corte y empalme del pre-ARNm está catalizado por el spliceosoma, un complejo de susbunidades especializadas de ARN y proteínas que elimina los intrones del segmento del pre-ARNm transcrito. El spliceosoma está compuesto por las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) U1, U2, U4, U5 y U6, junto con unas 80 proteínas conservadas. El SNRNP200 es un gen necesario para desenrollar el dúplex U4/U6, un paso esencial para la activación catalítica del spliceosoma (Maeder et al., 2009). La expresión del SNRNP200 se ha detectado en el corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo estriado, riñón y páncreas (Zhao et al., 2009). En fecha reciente se ha descubierto que las mutaciones del SNRNP200 están asociadas con la retinitis pigmentosa autosómica dominante (adRP) (Benaglio et al., 2011; Liu et al., 2012).

Dominio SAM, dominio SH3 y señales de localización nuclear 1 (SAMSN1)
El SAMSN1 pertenece a una nueva familia de genes de supuestos adaptadores y proteínas del armazón que contienen dominios SH3 y SAM (motivo alfa estéril). La SAMSN1 se expresa en tejidos hematopoyéticos, músculo, corazón, cerebro, pulmón, páncreas, células endoteliales y mielomas. Se ha demostrado que la expresión endógena de SAMSN1 aparece regulada al alza en linfocitos B primarios que han recibido estímulos de diferenciación y proliferación, y experimentos de transducción sugieren el papel estimulador de la SAMSN1 en la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas (Brandt et al., 2010). Estirpes celulares y células primarias de pacientes con leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple expresan la SAMSN1 (Claudio et al., 2001). La SAMSN1 apareció regulada a la baja en la estirpe celular del carcinoma de pulmón macrocítico Calu-6 (Yamada et al., 2008). La SAMSN1 se expresó diferencialmente en el cáncer relacionado con la colitis ulcerosa (Watanabe et al., 2011).

Transductor de señales y activador de la transcripción 2, 113 kDa (STAT2)
La STAT2 es una nueva contribuyente a la carcinogénesis colorrectal y cutánea que podría actuar aumentando la expresión génica y la secreción de mediadores proinflamatorios, lo que a su vez activa la vía de señalización oncógena de la STAT3 (Gamero et al., 2010). La STAT2 es un mediador crítico en la activación de la apoptosis inducida por los IFN de tipo I. Más importante aún, defectos en la expresión o en la localización nuclear de la STAT2 pueden mermar la eficacia de la inmunoterapia con IFN de tipo I (Romero-Weaver et al., 2010). Los astrocitomas de bajo grado presentan menos expresión de STAT2 que los astrocitomas de alto grado. Los resultados demuestran la relación existente entre la señalización de STAT y de PPARgamma en los tumores gliales y refuerzan el supuesto papel importante de las proteínas STAT en la regulación del crecimiento y la diferenciación de esos tumores (Ehrmann et al., 2008).

Complejo de transcripción CCR4-NOT, subunidad 1 (CNOT1)
El complejo desadenilasa CCR4-NOT humano consta al menos de nueve subunidades enzimáticas y no enzimáticas. La CNOT1 desempeña una función importante en la actividad enzimática del complejo CCR4-NOT, por lo que es crítica para el control de la desadenilación del ARNm y la degradación del mismo. La eliminación de la CNOT1 deteriora estructural y funcionalmente el complejo CCR4-NOT y propicia la estabilización de los ARNm, lo que provoca el incremento de la traducción y causa apoptosis por estrés del retículo endoplasmático. Ito et al. concluyeron que la CNOT1 contribuye a la viabilidad de la célula asegurando la actividad de la desadenilasa CCR4-NOT (Ito et al., 2011). La eliminación por medio de ARNsi de la CNOT1 endógena o

de otras subunidades de CCR4-NOT en células de cáncer de mama ocasiona la desregulación de genes diana del ERalfa (aumento de la inducción de genes diana del ERα TTF1 y c-Myc). Tales hallazgos definen la función del complejo CCR4-NOT humano como la de un represor transcripcional de la señalización de receptores nucleares que es importante para entender las vías moleculares involucradas en el cáncer (Winkler et al., 2006).

Serina-hidroximetiltransferasa 2 (mitocondrial) (SHMT2)

El gen SHMT2 codifica la forma mitocondrial de una enzima dependiente del piridoxal fosfato que cataliza la reacción reversible de la serina y del tetrahidrofolato en glicina y 5,10-metilentetrahidrofolato. El producto codificado es responsable principalmente de la síntesis de la glicina. En una enfermedad poligénica como el cáncer de pulmón cabe suponer que las interacciones entre genes desempeñan un papel importante en la determinación de la variabilidad fenotípica de los diversos subtipos de cáncer. Las interacciones entre los polimorfismos de MTHFR677, MTHFR1298 y SHMT podrían repercutir de forma significativa en la inestabilidad genética en los pacientes con cáncer de pulmón. En lo referente a alteraciones citogenéticas se ha demostrado que los linfocitos procedentes de pacientes con cáncer de pulmón que son expuestos al carcinógeno del tabaco 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona [NNK] presentan una frecuencia considerablemente mayor de daños citogenéticos cuando presentan las variantes alélicas MTHFR 677, MTHFR 1298 y SHMT (Piskac-Collier et al., 2011). Los estudios farmacogenómicos acerca del papel del polimorfismo del gen SHMT en la eficacia de los protocolos con 5-FU y FOLFIRI en pacientes con cáncer colorrectal revelaron un efecto notable que modificaba la supervivencia global (Timar et al., 2006).

Protooncogén Jun B (JUNB)

JunB es miembro de la familia AP-1 (proteína activadora-1) de factores de transcripción diméricos. El factor de transcripción AP-1 interviene en la proliferación, la transformación y la muerte celular (Shaulian and Karin, 2002). JunB podría estar regulado a través de la vía del NF-êB y su regulación al alza inducida por HGF podría desempeñar un papel importante en la regulación de la proliferación y la invasión celular a través de la expresión de la MMP-9 (Lee and Kim, 2012). JunB parece ejercer un efecto oncógeno en linfomas, en particular linfomas de Hodgkin (Shaulian, 2010). JunB es un regulador retrógrado esencial de la p16 y contribuye a mantener la senescencia celular que bloquea la transformación maligna de las células de amplificación transitoria (TAC), por lo que tendría una función importante en el control de la carcinogénesis prostática (Konishi et al., 2008). JunB promueve la invasividad del tumor y potencia la angiogénesis en el carcinoma de células renales (ccRCC) defectuoso para el gen VHL (Kanno et al., 2012).

Proteína transformante, dotada de espiral enrollada ácida 3 (TACC3)

La TACC3 forma un complejo con la ch-TOG (gen sobreexpresado en tumores de colon y hepático) y la clatrina que entrelaza los microtúbulos en las fibras del cinetocoro. La TACC3 se expresa en ciertos tejidos proliferativos como testículo, pulmón, bazo, médula ósea y timo, así como en los leucocitos de sangre periférica. La expresión de TACC3 está alterada en algunos tipos de tumores humanos. Dentro de la célula, la TACC3 está localizada tanto en los centrosomas como en los microtúbulos del huso, pero no en los microtúbulos astrales (Hood and Royle, 2011). La expresión de la TACC3 apareció correlacionada con la de la p53, y los pacientes cuyos tumores presentaban una elevada expresión de ambas proteínas manifestaban un pronóstico

notablemente peor que los pacientes con bajos niveles de expresión de ambas a tenor de los resultados de las inmunotinciones (P = 0,006). Se ha planteado que el aumento de la TACC3 podría conferir una ventaja proliferativa al NSCLC y contribuir a la progresión del tumor, y que la expresión de la TACC3 es un indicador pronóstico fiable del resultado clínico del NSCLC (Jung et al., 2006). TACC3 podría ser un regulador negativo de la vía de señalización Notch (Bargo et al., 2010).

RAD54 homólogo B (*S. cerevisiae*) (RAD54B)

La proteína de recombinación y reparación del ADN RAD54B es una proteína codificada por el gen homónimo en el ser humano. La RAD54 se une al ADN bicatenario y muestra actividad ATPasa en presencia de ADN. La proteína RAD54B humana es paráloga de la proteína RAD54, que desempeña funciones importantes en la recombinación homóloga. La recombinación homóloga (RH) es esencial para la reparación exacta de las roturas bicatenarias del ADN (DSB) (Sarai et al., 2008). La reducción de la expresión de RAD54B, gen que en el cáncer presenta mutaciones somáticas, causa inestabilidad cromosómica (CIN) en células de mamífero (McManus et al., 2009). La elevada expresión del gen RAD54B está asociada con un menor tiempo hasta la progresión y con una peor supervivencia global en pacientes con glioblastoma (Grunda et al., 2010).

Factor de elongación en la traducción eucariota 2 (EEF2)

El EEF2 codifica un miembro de la familia de los factores de elongación de la traducción unidos a GTP. Esta proteína es un factor esencial para la síntesis proteica. Promueve la translocación dependiente de GTP de la cadena proteínica naciente del sitio A al sitio P del ribosoma. La EEF2 aparece altamente expresada en el adenocarcinoma de pulmón (LADC), pero no en el tejido pulmonar circundante sano. Se ha sugerido que la eEF2 es un marcador antiapoptótico en el LADC, porque los pacientes con elevada expresión de eEF2 presentan una incidencia notablemente mayor de recurrencia tumoral temprana y un pronóstico significativamente peor. El silenciamiento de la expresión de eEF2 aumentó la elongación de las mitocondrias, la autofagia celular y la sensibilidad al cisplatino. Además, la eEF2 apareció SUMOilada en células de LADC, y la SUMOilación de la eEF2 estuvo correlacionada con la resistencia farmacológica (Chen et al., 2011a). La EEF2 es una diana atractiva para los tratamientos antitumorales porque su inhibición detiene con rapidez la síntesis proteica, induce la apoptosis y provoca en última instancia la muerte de la célula. El silenciamiento por medio de ARNsi de la EEF2 provocó citotoxicidad específica en células tumorales (Chen et al., 2011b; Wullner et al., 2008).

Ciclina A2 (CCNA2)

La CCNA2 pertenece a la familia altamente conservada de las ciclinas. Las ciclinas actúan como reguladores de las CDK-cinasas. Las diversas ciclinas manifiestan distintos patrones de expresión y degradación que contribuyen a la coordinación temporal de cada episodio de la mitosis (Deshpande et al., 2005). La ciclina humana A2 es un regulador clave de la progresión de la fase S y la entrada en la mitosis. La CCNA2 se une y activa a las cinasas CDC2 o CDK2, lo que promueve tanto el ciclo celular como las transiciones G1/S y G2/M (Honda et al., 2012). Las mutaciones, las amplificaciones y la sobreexpresión de este gen, que alteran la progresión del ciclo celular, se observaron con frecuencia en diversos tumores y pueden contribuir a la oncogénesis (Cooper et al., 2009; Kars et al., 2011; Kim et al., 2011; Tompkins et al., 2011). Asimismo, se ha descrito que la expresión de CCNA2 está relacionada con un

pronóstico malo en varios tipos de cáncer (Yasmeen et al., 2003) y que la expresión elevada de ciclina A estuvo correlacionada con períodos de supervivencia más cortos (Dobashi et al., 1998).

Transformante de células neuroepiteliales 1 (NET1) 41

La NET1 forma parte de la familia de factores de intercambio de nucleótidos guanina de Rho. Los miembros de esta familia activan las proteínas Rho catalizando el intercambio de GDP por GTP. La proteína codificada por NET1 interacciona con RhoA en el núcleo celular y podría intervenir en la reparación de los daños del ADN ocasionados por las radiaciones ionizantes.

El gen NET1, a diferencia de los receptores opioides, se expresa en células de adenocarcinoma de mama, cuya migración podría facilitar (Ecimovic et al., 2011). La NET1 está regulada al alza en tejido de cáncer gástrico (CG) e impulsa el fenotipo invasivo de esta enfermedad (Srougi and Burridge, 2011). La NET1 juega un papel importante en la migración y la invasión de las células de CG, aspectos clave en la progresión de dicho cáncer (Bennett et al., 2011). Las expresiones elevadas de RhoC y NET1 en el cáncer de próstata humano después de la terapia endocrina a corto plazo sugieren que ambas podrían convertirse en dianas terapéuticas durante dicha terapia (Kawata et al., 2012).

Marco de lectura abierto 24 del cromosoma 11 (C11orf24)

El gen C11orf24 fue descubierto por Twells et al (2001). C11orf24 no comparte ninguna similitud con otros genes conocidos y su función se desconoce. El análisis por transferencia Northern ha detectado una expresión elevada de un transcrito de 1,9 kb en el corazón, la placenta, hígado, páncreas y colon. Se han detectado niveles más bajos en el cerebro, el pulmón, músculo estriado, riñón, bazo, próstata, testículos, ovario e intestino delgado, y niveles muy bajos en el timo y los leucocitos (Twells et al., 2001). La proteína de 449 aminoácidos de longitud C11orf24 está localizada en la región cromosómica 11q13. Esta región aparece descrita como una región de sensibilidad a múltiples cánceres (Gudmundsson et al., 2009; Purdue et al., 2011).

Regulador de la condensación cromosómica 1 (RCC1)

El regulador de la condensación cromosómica 1 (RCC1) es el factor de intercambio de nucleótidos de guanina de la GTPasa Ran. La generación localizada de la Ran-GTP por la RCC1 en la cromatina es crítica para el transporte nucleo-citoplasmático, el ensamblaje del huso mitótico y la formación de la membrana nuclear (Hitakomate et al., 2010). Algunos datos indican que la unión del cromosoma a los reguladores mitóticos como RCC1, Mad2 y survivina es esencial para la progresión de la mitosis (Ho et al., 2008). Wong et al. han descubierto que la concentración en el núcleo de RanGTP disminuye durante las primeras etapas de la apoptosis, lo que está correlacionado con la inmovilización de la RCC1 en los cromosomas. Así pues, han propuesto que la RCC1 lee el código de histonas creado por la Mst1 activada por caspasas para iniciar la apoptosis reduciendo la concentración de RanGTP en el núcleo (Wong et al., 2009).

Familia del antígeno de melanoma F, 1 (MAGEF1)

La mayoría de los miembros de la superfamilia MAGE (antígeno asociado a melanoma) se expresan en los tumores, testículos y tejidos fetales, lo que ha sido descrito como un patrón de expresión de cáncer/testículo (MAGE subgrupo I). Los péptidos del subgrupo I han sido utilizados con éxito en vacunas peptídicas y de células dendríticas (Nestle et

al., 1998; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1995; Thurner et al., 1999). En cambio, ciertos genes MAGE (MAGE subgrupo II) como MAGEF1, se expresan de manera ubicua en todos los tejidos adultos y fetales así como en numerosos tipos de tumor, entre ellos ovario, mama, cuello uterino, melanoma y leucemia (Nestle et al., 1998; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1995; Thurner et al., 1999). No obstante, la sobreexpresión de MAGEF1 ha podido ser detectada en el NSCLC (Tsai et al., 2007) y en el 79% de una cohorte taiwanesa de pacientes con cáncer colorrectal (Chung et al., 2010).

Complejo de condensina I no SMC, subunidad D2 (NCAPD2)

Las condensinas son complejos heteropentaméricos que fueron descubiertas como componentes estructurales de los cromosomas mitóticos. La NCAPD2 es un componente esencial del complejo de la condensina humana necesario para la condensación cromosómica durante la mitosis. La eliminación de la NCAPD2 afecta a la alineación de los cromosomas durante la metafase y retrasa el inicio de la anafase (Watrin and Legagneux, 2005). Recientes estudios de ligamiento y asociación señalan a un locus cromosómico de 12p13 como posible ubicación de variantes genéticas que predisponen a la enfermedad de Alzheimer. Los análisis de asociación de marcador único revelaron las dos SNP contenidas en NCAPD2 (rs7311174 y rs2072374) con valores p nominales significativos (p = 0,0491 y 0,0116, respectivamente). Estos análisis genéticos aportan indicios de que el locus cromosómico 12p13 está asociado con la enfermedad de Alzheimer en chinos (Li et al., 2009).

Marco de lectura abierto 44 del cromosoma 12 (C12orf44)

Durante la búsqueda en bases de datos de ortólogos de una proteína que interaccionara con Atg13 de *Drosophila*, Mercer et al. (2009) identificaron el ATG101 humano, también conocido como C12orf44 (Mercer et al., 2009). El gen ATG101 se localizó en el cromosoma 12q13. 13. De la supuesta proteína de 218 aminoácidos se predijo que debía ser una proteína hidrófila citosólica (Hosokawa et al., 2009). La macroautofagia es un proceso catabólico de degradación de proteínas, orgánulos y macromoléculas citoplasmáticas a través de lisosomas. Las proteínas ATG, como la ATG101, son necesarias para la formación de autofagosomas, vesículas con membrana doble que rodean y secuestran la carga citoplasmática antes de la fusión con los lisosomas. La ATG101 (C12orf44) es esencial para la autofagia (Mercer et al., 2009).

Ligasa de proteína-ubiquitina E3 con dominios HECT y RLD número 4 (HERC4)

La HERC4 pertenece a la familia HERC de las ligasas de ubiquitina, cuyos miembros contienen un dominio HECT y al menos un dominio similar a RCC1 (MIM 179710) (RLD). Se ha predicho que el dominio de 350 aminoácidos HECT cataliza la formación de un tioéster con la ubiquitina antes de transferirla a un sustrato, y se ha predicho que el RLD actúa como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina para las proteínas G pequeñas (Hochrainer et al., 2005). La ligasa de ubiquitina de tipo E3 Herc4 se expresa ubicuamente en todos los tejidos, pero sobre todo en los testículos, especialmente durante la espermiogénesis. La ligasa Herc4 es necesaria para la maduración y la eliminación de la gota citoplasmática necesaria para que el espermatozoide adquiera plena funcionalidad (Rodriguez and Stewart, 2007).

Proteína 3 de unión al ARNm del factor de crecimiento insulinoide 2 (IGF2BP3)

IGF2BP3 pertenece a de la familia de proteínas de unión al ARNm del factor de crecimiento insulinoide II, implicada en la localización, el recambio y el control

traduccional del ARNm. La proteína contiene varios dominios KH (de homología K) que son importantes para la unión al ARN y que se sabe que están implicados en la síntesis y en el metabolismo del mismo. La expresión ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario, y ha sido descrita en algunos tumores. Por ello la IGF2BP3 es considerada una proteína oncofetal (Liao et al., 2005). La IGF2BP3 podría promover la proliferación de las células tumorales potenciando la síntesis de la proteína IGF-II e induciendo la adhesión y la invasión de células a través de la estabilización del ARNm de CD44 (Findeis-Hosey and Xu, 2012). Asimismo, la expresión de IGF2BP3 ha sido estudiada en numerosas neoplasias humanas con crecientes indicios de su intervención en la migración, invasión y supervivencia celular y en la metástasis tumoral (Jeng et al., 2009; Kabbarah et al., 2010; Li et al., 2011; Liao et al., 2011; Lu et al., 2011; Hwang et al., 2012; Samanta et al., 2012) así como su posible implicación en la angiogénesis (Suvasini et al., 2011; Chen et al., 2012). En el adenocarcinoma de pulmón se puede detectar una mayor frecuencia de expresión de la IGF2BP3 en los adenocarcinomas moderada o escasamente diferenciados, que podría estar asociada con un comportamiento biológico agresivo (Findeis-Hosey et al., 2010; Beljan et al., 2012; Findeis-Hosey and Xu, 2012).

Homólogo del ciclo de división celular 6 (*S. cerevisiae*) (CDC6)

La proteína CDC6 actúa como regulador en los primeros pasos de la replicación del ADN. Está localizada en el núcleo celular durante la etapa G1 del ciclo celular, pero se traslada al citoplasma al inicio de la fase S. Asimismo, se supone que la CDC6 regula la activación del punto de control de la replicación a través de su interacción con ATR en las células eucariotas superiores (Yoshida et al., 2010). La CDC6 es esencial para la replicación del ADN y su desregulación está involucrada en la carcinogénesis. Se ha descubierto que la regulación a la baja de la CDC6 mediante ARN de interferencia (ARNi) impide la proliferación celular y promueve la apoptosis (Lau et al., 2006). La sobreexpresión de la CDC6 se ha constatado en varios tipos de cáncer. Entre los tipos de cáncer que sobreexpresan el CDC6 se hayan el cáncer gástrico (Tsukamoto et al., 2008), tumores cerebrales (Ohta et al., 2001), carcinoma epidermoide bucal (Feng et al., 2008), carcinoma de cuello uterino (Wang et al., 2009b) y mesotelioma maligno (Romagnoli et al., 2009).

Proteína de activación de fibroblastos, alfa (FAP)

La proteína de activación de fibroblastos (FAP) es una glucoproteína de membrana integral de tipo II perteneciente a la familia de las proteasas de serina. La supuesta actividad proteasa de serina de la FAP alfa y su patrón de inducción *in vivo* podrían indicar la implicación de esta molécula en el control del crecimiento de los fibroblastos o en las interacciones entre el epitelio y el mesénquima durante el desarrollo, la reparación de tejidos y la carcinogénesis epitelial (Scanlan et al., 1994). La mayoría de los tejidos adultos normales y los tumores epiteliales benignos presentan una escasa o nula expresión de FAP. En cambio se detecta la expresión de FAP en el estroma de más del 90% de los tumores malignos de mama, colorrectales, pulmonares, cutáneos y pancreáticos, así como en los fibroblastos de heridas en cicatrización, sarcomas de partes blandas, y en algunas células mesenquimáticas fetales. La FAP tiene un papel potencial en el crecimiento tumoral y la metástasis a través de los procesos de adhesión y migración celular, así como en la rápida degradación de los componentes de la matriz extracelular. Por ello está presente en células tumorales que invaden la matriz extracelular y en células endoteliales involucradas en la angiogénesis, pero no se

expresa en las células inactivas del mismo tipo (Dolznig et al., 2005; Kennedy et al., 2009; Rettig et al., 1993; Rettig et al., 1994; Scanlan et al., 1994; Zhang et al., 2010a).

Familia del sitio de integración MMTV del tipo áptero (*wingless*), miembro 5A (WNT5A)

En general, la Wnt5a regula diversas funciones celulares como la proliferación, diferenciación, migración, adhesión y polaridad (Kikuchi et al., 2012). Se expresa en células madre embrionarias humanas indiferenciadas (Katoh, 2008). La WNT5A se clasifica como miembro no transformante de la familia WNT, cuya implicación en la carcinogénesis no se ha dilucidado todavía. Presenta una acción supresora de tumores en algunos tipos de cáncer (de tiroides, cerebral, de mama, y colorrectal), pero aparece regulado al alza de modo aberrante en tumores de pulmón, estómago y próstata (Li et al., 2010). La WNT5A oncógena activa la vía de señalización canónica WNT en células madre cancerosas que estimula la autorrenovación, y la vía no canónica WNT en la interfase tumor-estroma que propicia la invasión y la metástasis (Katoh and Katoh, 2007). La expresión de la WNT5A ha sido descrita en diversas entidades tumorales. Por ejemplo, la expresión proteica anormal de Wnt5a se ha observado en un 28% de casos de cáncer de próstata, en los que promueve la malignidad (Yamamoto et al., 2010). Asimismo, la sobreexpresión de WNT5A se ha vinculado con un mal pronóstico y/o con el aumento del grado tumoral en el cáncer de ovario (Badiglian et al., 2009), melanoma (Da Forno et al., 2008; Weeraratna et al., 2002), GBM (Yu et al., 2007), cáncer de pulmón (Huang et al., 2005) y cáncer pancreático (Ripka et al., 2007). En el CHC, parece que la vía canónica de Wnt contribuye a la iniciación del tumor y la vía no canónica a la progresión tumoral (Yuzugullu et al., 2009).

TPX2, asociada a microtúbulos, homólogo (*Xenopus laevis*) (TPX2)

El TPX2 es un factor que interviene en el ensamblaje del huso mitótico. Es necesario para asegurar el ensamblaje normal del huso mitótico y de los microtúbulos durante la apoptosis. La TPX2 es necesaria para la nucleación del microtúbulo dependiente de la cromatina y/o del cinetocoro (Bird and Hyman, 2008; Moss et al., 2009). La TPX2 sintetizada *de novo* es necesaria para la activación de casi todas las Aurora A y la síntesis plena de p53 y la fosforilación *in vivo* durante la maduración del ovocito (Pascreau et al., 2009). La TPX2 es una proteína asociada al ciclo celular que se sobreexpresa en numerosos tipos de tumor, como meningiomas (Stuart et al., 2010), carcinoma epidermoide de laringe (SCCL) (Cordes et al., 2010), carcinoma epidermoide bucal (SCC) (Shigeishi et al., 2009), carcinomas hepatocelulares (HCC) (Satow et al., 2010), tumor pancreático (Warner et al., 2009), cáncer de ovario (Ramakrishna et al., 2010) y carcinoma epidermoide de pulmón (Lin et al., 2006; Ma et al., 2006). A menudo aparece sobreexpresada conjuntamente con Aurora-A, lo que da pie a una nueva unidad funcional con propiedades oncógenas (Asteriti et al., 2010). La expresión de TPX2 es un indicador pronóstico del cáncer de pulmón (Kadara et al., 2009).

Receptor de la motilidad mediada por el hialuronano (RHAMM) (HMMR)

El receptor de motilidad mediada por hialuronano RHAMM (HMMR) ejerce diferentes funciones tanto en el interior de la célula como en la membrana celular. La RHAMM se exporta a la superficie de la célula donde se une al ácido hialurónico (AH) e interactúa con el receptor del AH CD44. Procesos como la motilidad celular, la cicatrización de heridas y la invasión están modulados por la RHAMM (Sohr and Engeland, 2008). La RHAMM (receptor de la motilidad mediada por el hialuronano) es uno de los receptores del hialuronano (HYA) (Gares and Pilarski, 2000). Las células cancerosas también

exhiben sitios de unión (CD44, RHAMM, etc.) para el HYA y este las protege contra el ataque de las células inmunitarias. La concentración de HYA en suero a menudo está elevada en los pacientes con metástasis (Delpech et al., 1997). Además, la interacción de HYA con RHAMM (HMMR) y CD44 en las células cancerosas se ha postulado como importante para la progresión y la diseminación del tumor (Li et al., 2000b). La RHAMM también se sobreexpresa en varios tipos de tejido tumoral (Tzankov et al., 2011), (Kramer et al., 2010), (Twarock et al., 2010), (Shigeishi et al., 2009), (Zlobec et al., 2008) y (Li et al., 2000a)).

Metalopeptidasa ADAM dominio 8 (ADAM8)

La ADAM8 pertenece a la familia ADAM (dominio de desintegrina y metaloproteasa). Muchos tipos de ADAM, incluida la ADAM8, se expresan en tumores malignos humanos, donde intervienen en la regulación de las actividades de los factores de crecimiento y las funciones de las integrinas, que conducen a la estimulación del crecimiento y la invasión celular (Mochizuki and Okada, 2007). La expresión de ADAM8 apareció correlacionada positivamente con el EGFR. Ambos se expresaron principalmente en el citoplasma y en la membrana celular (Wu et al., 2008). ADAM8 se expresó con profusión en la gran mayoría de neoplasias de pulmón examinadas. La expresión exógena de ADAM8 aumentó la actividad migratoria de células de mamífero, un indicativo de su posible papel relevante en la progresión del cáncer de pulmón (Ishikawa et al., 2004). La ADAM8 ha sido vinculada con un pronóstico malo del cáncer de pulmón (Hernandez et al., 2010). La sobreexpresión de ADAM8 estuvo asociada con una supervivencia más corta y fue un buen predictor de metástasis a distancia en el CCR (Roemer et al., 2004b; Roemer et al., 2004a). Además, los niveles de expresión y las actividades proteasa de ADAM8 aparecieron correlacionados con la actividad invasiva de las células de glioma, lo que indica su posible papel relevante en la invasión tumoral en el cáncer cerebral (Wildeboer et al., 2006).

Proteína de la cadena alfa-3 del colágeno (VI) (COL6A3)

El COL6A3 codifica la cadena alfa-3, una de las tres cadenas alfa del colágeno de tipo VI. Los dominios de la proteína se unen a proteínas de la matriz extracelular, interacción que explica la importancia de este colágeno en la organización de los componentes de dicha matriz.

La remodelación de la matriz extracelular debida a la sobreexpresión del colágeno VI contribuye a la resistencia al cisplatino de las células de cáncer de ovario. La presencia de colágeno VI estuvo correlacionada con el grado del tumor, un factor pronóstico del cáncer de ovario (Sherman-Baust et al., 2003). La COL6A3 está sobreeexpresada en el tumor colorrectal (Smith et al., 2009a), carcinoma de glándulas salivales (Leivo et al., 2005) y se expresa de forma diferencial en el cáncer gástrico (Yang et al., 2007). La COL6A3 ha sido identificada en uno de siete genes con variantes de corte y empalme específicas de tumor. Las alteraciones validadas del corte y empalme específicas de tumor resultaron muy uniformes, lo que permitió distinguir con claridad entre las muestras normales y las cancerosas y, en algunos casos incluso entre diferentes estadios tumorales (Thorsen et al., 2008).

Antígeno de superficie celular Thy-1 (THY1)

La Thy-1 (CD90) es una glucoproteína con anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) de 25-37 kDa que se expresa en muchos tipos celulares, incluidos linfocitos T, timocitos, neuronas, células endoteliales y fibroblastos. La activación de Thy-1 puede promover la

activación de los linfocitos T. La Thy-1 también interviene en numerosos procesos biológicos no inmunitarios, tales como la adhesión celular, el crecimiento de neuritas, crecimiento y supresión de tumores, migración, cicatrización de heridas y muerte celular. La Thy-1 es un regulador importante de las interacciones entre células y entre célula y matriz, con importantes intervenciones en la regeneración nerviosa, la metástasis, inflamación y fibrosis (Rege and Hagood, 2006b; Rege and Hagood, 2006a). Asimismo, la Thy-1 parece ser un marcador de la angiogénesis adulta pero no de la embrionaria. La regulación al alza de la Thy-1 por parte de las citocinas sin la implicación de ningún factor de crecimiento indica la importancia de la inflamación en la patogenia de la angiogénesis adulta (Lee et al., 1998). En los núcleos de células de cáncer de pulmón se observa una notable sobreexpresión de la Thy-1 respecto al tejido normal o células de tumor benigno de pulmón, y es uno de los factores relacionados con el pronóstico de los pacientes con NSCLC. Así pues, la Thy-1 podría ser un nuevo marcador maligno latente en la patología del cáncer de pulmón(Chen et al., 2005b). La Thy-1 se puede considerar un marcador indirecto de varios tipos de células madre (células madre mesenquimáticas, células madre hepáticas («células ovales») (Masson et al., 2006), células madre queratinocíticas (Nakamura et al., 2006) y hematopoyéticas (Yamazaki et al., 2009).

Desyodinasa, yodotironina, tipo II (DIO2)

La proteína codificada por el gen DIO2 pertenece a la familia de las yodotironina-desyodinasas. Aparece expresada notablemente en la tiroides y podría contribuir de forma significativa al aumento relativo de la producción de la hormona tiroidea T3 en pacientes con enfermedad de Graves y adenomas tiroideos (Meyer et al., 2008); (de Souza Meyer et al., 2005)). Los patrones de expresión génica de los tipos carcinoma nasofaríngeo de progresión local y de progresión a distancia difieren significativamente. La expresión del gen DIO2 es mayor en el tipo de progresión con metástasis a distancia que en el tipo de crecimiento e invasión local de la base del cráneo, lo que puede estar estrechamente relacionado con el potencial metastásico del carcinoma nasofaríngeo (Liang et al., 2008). En tumores cerebrales aparece tanto el ARNm de DIO2 como la actividad de la propia DIO2 (Murakami et al., 2000). La actividad D2 también está presente en el pulmón y es similar tanto en el tejido canceroso como en el tejido pulmonar circundante (Wawrzynska et al., 2003).

Periostina, factor específico de osteoblastos (POSTN)

El POSTN es un gen que codifica una proteína con similitudes con la familia de la fasciclina, que está implicada en la supervivencia celular y la angiogénesis, por lo que se ha erigidocomo un marcador prometedor de la progresión tumoral en varios tipos de cáncer humano (Ruan et al., 2009).

Se ha detectado la expresión elevada del ARNm de la periostina o de la propia proteína en la mayor parte de los tumores sólidos, entre ellos el carcinoma de mama (Zhang et al., 2010b), colon (Kikuchi et al., 2008), cabeza y cuello (Kudo et al., 2006), páncreas (Kanno et al., 2008), tiroides papilar (Puppin et al., 2008), próstata (Tischler et al., 2010), ovario (Choi et al., 2010), pulmón (Takanami et al., 2008) e hígado (Utispan et al., 2010), así como en el carcinoma epidermoide de esófago (Kwon et al., 2009). La periostina se expresa de forma anómala en el cáncer de pulmón, donde aparece correlacionada con angiogénesis, invasión y metástasis (Takanami et al., 2008). El silenciamiento de la periostina en células de cáncer de pulmón amicrocítico A549

(NSCLC) inhibe el crecimiento y reduce la capacidad invasiva de las células tumorales(Wu et al., 2013).

SLIT1 (homólogo de slit 1 (*Drosophila*)), SLIT2 (homólogo de slit 2 (*Drosophila*))
Las SLIT (SLIT1, SLIT2 y SLIT3) son una familia de proteínas de secreción que intervienen en las interacciones posicionales entre las células y el entorno durante el desarrollo mediante la señalización a través de receptores ROBO (Hinck, 2004). La señalización SLIT/ROBO no se limita al desarrollo, y la pérdida de estas señales probablemente desempeña un papel importante en la progresión tumoral. Los genes Slit y Robo se consideran candidatos a supresores de tumores porque sus promotores aparecen con frecuencia hipermetilados en varios tipos de cáncer epitelial (Narayan et al., 2006; Schmid et al., 2007; Latil et al., 2003). En cerca del 50% de los tumores de mama humanos analizados la expresión de los genes SLIT2 o SLIT3 está reprimida (Sharma et al., 2007). La hipermetilación de SLIT2 se ha detectado con frecuencia en el NSCLC y se ha vinculado con diversas características clínicas (Suzuki et al., 2013).

TLX3 (leucemia de linfocitos T, homeosecuencia 3)
El TLX3 (también llamado RNX o HOX11L2) pertenece a la familia de los genesde homeosecuencia huérfanos que codifican factores de transcripción nucleares que se unen al ADN. Los miembros de la familia de genes HOX11 se caracterizan por contener en el homeodominio altamente conservado, en concreto en la posición 47, una treonina que sustituye a una citosina (Dear et al., 1993). La TLX3 sólo se expresa en el bulbo raquídeo en desarrollo y es necesaria para la correcta formación de las neuronas sensoriales viscerales de proyección de primer orden y de la mayoría de los centros (nor)adrenérgicos del tronco encefálico, especialmente los involucrados en el control fisiológico de los sistemas cardiovascular y respiratorio (Qian et al., 2001). La expresión de la TLX3 también se ha detectado en muestras de leucemia procedentes de un 20% de niños y un 13% de adultos afectados por leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (Cave et al., 2004), aunque este gen nunca ha estado implicado en la diferenciación normal de dichos linfocitos (Ferrando et al., 2004).

CEP192 (proteína centrosómica de 192 kDa)
Los centrosomas desempeñan una función importante en varios procesos celulares como la formación del huso y la segregación de los cromosomas. La CEP192 es una proteína centrosómica que desempeña un papel esencial en la biogénesis y la función del centrosoma en mamíferos, *Drosophila* y *C. elegans* (Gomez-Ferreria et al., 2012). Estimula la formación del andamiaje sobre el cual los complejos anulares de gamma tubulina y otras proteínas implicadas en la nucleación de los microtúbulos y en el montaje del huso adquieren la funcionalidad durante la mitosis (Gomez-Ferreria et al., 2007).

ANKS1A (con repetición de anquirina y dominio de motivo alfa estéril 1A)
La proteína 1A con repetición de anquirina y dominio SAM es una proteína que en el ser humano está codificada por el gen ANKS1A (Nagase et al., 1996). La ANKS1A fue descrita por primera vez como diana y transmisora de señales de receptores con actividad tirosina-cinasa como EGFR y PDGFR (Pandey et al., 2002) y, más recientemente, como compañera de interacción del receptor con actividad tirosina-cinasa EphA8 (Shin et al., 2007). En un estudio reciente se genotiparon polimorfismos mononucleotídicos (SNP) en 348 pacientes con NSCLC avanzado, identificándose 17

SNP candidatos relacionados con el pronóstico. Los SNP están localizados en la región genómica del gen ANKS1A (Lee et al., 2013).

CEP250 (proteína centrosómica de 250 kDa)

El gen CEP250 codifica una proteína central del centrosoma necesaria para mantener la cohesión entre los centríolos durante la interfase del ciclo celular (Mayor et al., 2002). Por medio del análisis de híbridos de radiación, Fry et al. (1998) localizaron el gen CEP250 en la región centromérica del cromosoma 20, aproximadamente en 20q11. 2 (Fry et al., 1998). Mayor et al. (2002) descubrieron que la sobreexpresión de CEP250 en una estirpe de células de osteosarcoma humano provocaba la formación de grandes estructuras asociadas al centrosoma. La sobreexpresión de CEP250 no interfirió con la separación de los centrosomas ni la división celular, lo que indica que la actividad regulada en el ciclo celular separa a la CEP250 de los centrosomas (Mayor et al., 2002).

MDN1 (MDN1, homóloga de midasina (levadura))

La MDN1, homóloga de midasina (levadura) es una proteína codificada por el gen MDN1 en el ser humano. La midasina está presente como un gen de copia única que codifica una proteína de unos 600 kDa muy conservada en todos los eucariotas de los que se dispone de datos. En el ser humano el gen se ha localizado en 6q15 y codifica una proteína predicha de 5596 residuos (632 kDa) (Garbarino and Gibbons, 2002). Recientemente la MDN1 se ha hallado mutada en el cáncer de mama del subtipo B luminal. La MDN1 podría intervenir en el desarrollo y en la resistencia a la hormonoterapia de este subtipo agresivo (Cornen et al., 2014).

OLFM1 (olfactomedina 1)

La OLFM1, también llamada noelina-1, es una glucoproteína de secreción perteneciente a una familia de proteínas portadoras de un dominio de olfactomedina; desempeña una función importante en la regulación de la producción de células de la cresta neural por el tubo neural (Barembaum et al., 2000). La olfactomedina se detectó originalmente como el principal componente de la capa mucosa que envuelve las dendritas quimiosensoriales de las neuronas olfatorias (Kulkarni et al., 2000). La expresión de la proteína olfactomedina 1 resultó significativamente mayor en el adenocarcinoma de pulmón que en otros tipos histológicos de cáncer de pulmón y que en tejidos pulmonares normales (Wu et al., 2010). Asimismo, el gen OLFM1 aparece desregulado en el cáncer de endometrio, el sarcoma de Ewing y el neuroblastoma (Wong et al., 2007; Allander et al., 2002; Khan et al., 2001).

BUB1B (gemación desinhibida por bencimidazoles 1 homólogo beta (levadura))

El BUB1B, también llamado BubR1, es un componente del punto de control central de la mitosis que se une e inhibe el complejo promotor de la anafase activado por la Cdc20 (APC/CCdc20), una ligasa de ubiquitina de tipo E3 que inicia la anafase al orquestar la escisión por parte de la separasa de los anillos cohesivos que mantienen unidas las cromátidas hermanas (Baker et al., 2004). La BubR1 no sólo contribuye a la correcta segregación de los cromosomas a través de la activación del punto de control mitótico sino también mediante la regulación de los anclajes de los cromosomas al huso (Malureanu et al., 2009; Lampson and Kapoor, 2005). En muchos tipos de cáncer se ha constatado la alteración de la función de punto de control del huso. Las mutaciones de BubR1 se han relacionado con la aneuploidía variegada en mosaico (MVA), un raro síndrome humano caracterizado por aneuploidization, predisposición a los tumores y

diversos rasgos progeroides, tales como esperanza de vida breve, retraso del crecimiento y mental, cataratas y dismorfismo facial (Matsuura et al., 2006).

PI4KA (fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, alfa)
En las células humanas se expresan cuatro fosfatidilinositol 4-cinasas (PI4K) distintas. Dichas isoenzimas (PI4KA, PI4KB, PI4K2A y PI4K2B) catalizan la fosforilación del fosfatidilinositol (PtdIns) en la cara citoplasmática de la membrana celular, que conduce a la producción de fosdatidilinositol 4-fosfato (PtdIns4P) (Minogue and Waugh, 2012). La PI4KA se encuentra principalmente en el retículo endoplasmático (RE). Su actividad parece regular tanto la formación de los sitios de salida del RE (Blumental-Perry et al., 2006) como la concentración de PtdIns4P en la membrana plasmática (Balla et al., 2008). Un grupo de investigación ha descubierto que el ARNm de la PI4KA es más abundante en el CHC que en los tejidos sanos normales. Esta regulación al alza estuvo correlacionada significativamente tanto con la diferenciación escasa como con la proliferación activa del CHC. Así pues, la PI4KA podría servir como nuevo marcador molecular para mejorar los actuales modelos pronósticos del CHC (Ilboudo et al., 2014).

AURKB (cinasa aurora B)
La cinasa aurora B es una proteína que interviene en la unión del huso mitótico al centrómero (Kim et al., 2011). Está situada en los microtúbulos cercanos a los cinetocoros (Kunitoku et al., 2003). Las cinasas aurora aparecen sobreexpresadas en varias estirpes de células tumorales, lo cual apunta a su posible intervención en la oncogénesis, motivo por el cual ya se han convertido en dianas potenciales para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer (Fu et al., 2007). En fecha reciente se ha identificado la «firma génica» de cinco genes (TOP2A, AURKB, BRRN1, CDK1 y FUS) que están estrechamente relacionados con los desenlaces de los pacientes con NSCLC. Los resultados indican que los genes implicados en la condensación cromosómica, como AURKB, probablemente estén vinculados con propiedades similares a las de las células madre y podrían predecir la supervivencia en el adenocarcinoma de pulmón (Perumal et al., 2012).

SLC3A2 (familia de transportador soluble 3 (activadores del transporte de aminoácidos dibásicos y neutros), miembro 2)
La SLC3A2 comprende la subunidad ligera del transportador de aminoácidos neutros grandes (LAT1) que también se conoce como CD98 (clúster de diferenciación 98) (Lemaitre et al., 2005). El heterodímero CD98 consiste en una cadena pesada transmembrana de paso único de tipo II (CD98hc, también llamado cadena pesada de antígeno 4F2 o FRP-1; codificado por los genes SLC3A2 en el hombre y Slc3a2 en el ratón) tiene ~80–85 kDa y está unida por puentes disulfuro a una cadena ligera de paso múltiple de ~40 kDa (Deves and Boyd, 2000). La CD98hc interviene en la amplificación de la señalización de las integrinas y en el transporte de aminoácidos; ambas funciones pueden contribuir a la supervivencia y la proliferación celular (Cantor and Ginsberg, 2012). Muchos tumores expresan la CD98hc (SLC3A2), estando correlacionada la expresión con un mal pronóstico en los linfomas de linfocitos B. Asimismo, casi todos los estudios que han examinado la expresión de la CD98hc o de las cadenas ligeras CD98 en tumores sólidos demuestra que su expresión está correlacionada con tumores progresivos o metastásicos (Kaira et al., 2009).

IFT81 (transporte intraflagelar 81 homólogo (*Chlamydomonas*))

El transporte intraflagelar (IFT) de precursores ciliares como la tubulina desde el citoplasma hasta el extremo del cilio interviene en la construcción del cilio, orgánulo filiforme común en las células eucariotas. La reducción de la expresión de IFT81 y los experimentos de rescate con mutantes puntuales demostraron que la unión de la IFT81 a la tubulina es necesaria para la ciliogénesis en las células humanas (Bhogaraju et al., 2013). Junto con la IFT74/72, la IFT81 constituye un complejo central para construir las partículas IFT necesarias para la formación del cilio (Lucker et al., 2005).

COG4 (componente del complejo oligomérico de Golgi 4)
El complejo COG consiste en ocho subunidades numeradas COG1–8 (Ungar et al., 2002; Whyte and Munro, 2001) organizadas en dos subcomplejos: COG1–4 (Lóbulo A) y COG5–8 (Lóbulo B) (Ungar et al., 2005). El complejo COG interviene en la aproximación de las vesículas que reciclan las proteínas residentes en el aparato de Golgi (como las enzimas de glucosilación) (Pokrovskaya et al., 2011). El gen COG4 ha sido localizado en el cromosoma 16q22. 1 (Reynders et al., 2009). Ungar et al. (2002) concluyeron que dicho gen es crítico para la estructura y la función del aparato de Golgi y puede influir en el tráfico a través de las membranas intracelulares (Ungar et al., 2002).

NCBP1 (proteína de unión al casquete nuclear subunidad 1, 80 kDa)
El complejo proteínico de unión al casquete es una proteína de unión al ARN que se une al casquete 5' de la ARN-polimerasa II. Kataoka et al. (1994) describieron la clonación de un gen codificante de una proteína de unión al casquete nuclear de 80 kD (NCBP1) hallada en extractos nucleares de células HeLa, que podría intervenir en el ayuste del ARNm y en la exportación del ARN (Kataoka et al., 1994). Mediante la hibridación con ADN genómico procedente de un panel híbrido de células somáticas, Chadwick et al. (1996) localizaron el gen NCBP1 en 9q34. 1 (Chadwick et al., 1996).

NEFH (neurofilamento, polipéptido pesado)
El gen NEFH codifica la cadena pesada del neurofilamento, uno de los componentes principales de los neurofilamentos del citoesqueleto neuronal. El gen del polipéptido pesado del neurofilamento (NEFH, 200 kD) reside en la banda cromosómica 22q12. 2 y se ha propuesto como marcador de ADN para el diagnóstico presintomático en las familias con neurofibromatosis de tipo 2 (NF2). La pérdida o la regulación a la baja del NEFH ha sido descrita sobre todo en tumores del sistema nervioso autónomo y en neurocitomas centrales humanos (Mena et al., 2001; Segal et al., 1994). De igual modo se ha observado ausencia o disminución de la expresión de NEFH en el cáncer de próstata humano (Schleicher et al., 1997), el tumor epitelioide de células claras (Tanaka et al., 2000) y el carcinoma pulmonar microcítico (Bobos et al., 2006). Resulta destacable que la sobreexpresión del NEFH alteró la estructura y la función celular normales y propició la muerte celular (Szebenyi et al., 2002).

Descripción detallada de la invención

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 «péptido» tal y como se utiliza en la presente memoria designa una serie de residuos de aminoácidos, conectados entre sí normalmente 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 8 aminoácidos y hasta 10, 11, 12, 13 o 14 de longitud, y, en el caso de los péptidos de MHC de clase II pueden tener hasta 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud.

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

El término «péptido» incluye «oligopéptido». El término «oligopéptido» tal y como se utiliza en la presente memoria designa una serie de residuos de aminoácidos, conectados entre sí normalmente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial para la invención, siempre que se mantenga el epítopo o epítopos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener menos una longitud inferior a unos 30 y mayor de 15 residuos de aminoácidos, aproximadamente.

El término «los péptidos de la presente invención2 incluirá los péptidos de los que consiste o comprende un péptido tal y como se ha definido antes según las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92.

El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí normalmente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crucial para la invención, siempre que contenga los epítopos adecuados. A diferencia de los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a moléculas que contengan 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, es 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 «epítopo» de linfocito T de clase I requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y habitualmente de 9.

En el ser humano hay tres *locus* genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA)):HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y

HLA-B*07 son ejemplos de distintos alelos de MHC de clase I que se pueden expresar a partir de esos *locus*.

Tabla 2: Frecuencias de expresión F del HLA*A02 y de los serotipos HLA-DR más frecuentes. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas G_f en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori et al., 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-G_f)^2$. Las combinaciones de A*02 con determinados alelos HLA-DR podrían ser más abundantes o menos 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).

	Frecuencias de expresión de los serotipos HLA-DR y HLA*02 en subpoblaciones de Norteamérica			
Alelo HLA	Americanos de raza blanca	Afroamericano	Americanos de origen asiático	Hispanoamericanos
A*02	49,1%	34,1%	43,2%	48,3%
DR1	19,4%	13,2%	6,8%	15,3%
DR2	28,2%	29,8%	33,8%	21,2%
DR3	20,6%	24,8%	9,2%	15,2%
DR4	30,7%	11,1%	28,6%	36,8%
DR5	23,3%	31,1%	30,0%	20,0%
DR6	26,7%	33,7%	25,1%	31,1%
DR7	24,8%	19,2%	13,4%	20,2%
DR8	5,7%	12,1%	12,7%	18,6%
DR9	2,1%	5,8%	18,6%	2,1%

Por tanto, a efectos terapéuticos y de diagnóstico sería muy deseable contar con un péptido que se una, con la afinidad adecuada, a varios receptores HLA de clase II distintos. Un péptido que se une a varias moléculas HLA de clase II distintas recibe el nombre de ligando promiscuo.

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ADN incluye tanto el ADN monocatenario como el bicatenario. Por lo tanto, 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 formar parte de un gen normal, mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos por los expertos en la síntesis de ADN.

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 ligadores cortos de oligonucleótidos, 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 expresarse.

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

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

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, sin materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y de sus secuencias de nucleótidos constituyentes mediante métodos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes en dirección 3' (*downstream*) desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

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

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

El término «aislado» define el material que se extrae de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si ocurre de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos podrían ser partes de una composición y seguir estando aislados de forma que dicho vector o composición no fuera parte de su entorno natural.

Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunógenos, descritos de acuerdo con la presente invención también pueden presentarse en una 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 que genera una respuesta inmunitaria(es decir, que posee actividad inmunógena) cuando se administra − solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado − 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 aquí, 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, dichos términos se refieren a los productos generados por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas habituales.

Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje idéntico», 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:

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 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.

Los péptidos originales (no modificados) 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 como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu, Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg, Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val, Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr, 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 de la presente memoria. Además, los aminoácidos que contienen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también se pueden usar para hacer sustituciones, con el fin de producir inmunógenos y polipéptidos inmunógenos conformes a la presente invención.

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

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.

En la **Tabla 3** se exponen combinaciones de las elongaciones conformes a 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 pueden ser 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.

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 (CTL) 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.

Preferiblemente, cuando los CTL específicos para un péptido de la SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92 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 μM, 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 CTL de más de un individuo, de al menos dos, y más preferiblemente de tres individuos.

Así pues, los epítopos de la presente invención pueden ser idénticos a los epítopos específicos de tumor o asociados a tumor naturales o pueden incluir epítopos que difieran como máximo en 4 residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.

La estimulación de la respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos, reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha abierto la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir en el crecimiento del tumor. En la inmunoterapia del cáncer, actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las ramas humoral y celular del sistema inmunitario.

Elementos específicos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre poblaciones de células infiltradas en el tumor o en sangre periférica sugiere que dichas células desempeñan una función importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. En particular, en esta respuesta desempeñan una importante función los linfocitos T CD8 positivos (CD8+), los cuales reconocen moléculas de clase I de los péptidos portadores del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de entre, normalmente, 8 y 12 residuos, que derivan de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIP) localizados en el citosol. Las moléculas MHC humanas también se designan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas que presentan péptidos resultantes de la escisión proteolítica de proteínas principalmente endógenas, citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos más largos. A pesar de lo anterior, en las moléculas MHC de clase I también se suelen encontrar péptidos derivados de compartimentos endosómicos o fuentes exógenas. En la bibliografía sobre el tema, a esta forma de presentación de clase I poco habitual se la denomina presentación cruzada.

Teniendo en cuenta que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y de CD4, contribuyen conjuntamente y de forma sinérgica al efecto antitumoral, el desarrollo de vacunas antitumorales requiere de la identificación y caracterización de antígenos asociados a tumor que sean reconocidos por los linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ (molécula

MHC de clase I) o $CD4^+$ (molécula MHC de clase II). Un objeto de la presente invención es, por tanto, proporcionar composiciones de péptidos dotadas de péptidos que se unan a complejos MHC de ambas clases.

A la luz de los efectos secundarios graves y los gastos que supone el tratamiento contra el cáncer es evidente la urgente necesidad de mejora de los métodos pronósticos y diagnósticos. Así pues, existe la necesidad de descubrir otros factores que puedan servir como biomarcadores para el cáncer en general y el cáncer de pulmón en particular. Existe igualmente la necesidad de identificar factores que puedan ser utilizados en el tratamiento contra el cáncer en general y contra el cáncer de pulmón en particular.

La presente invención proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente de pulmón, más preferentemente de carcinoma de pulmón amicrocítico (NSCLC) que sobrepresentan o presentan exclusivamente los péptidos de la invención. Con técnicas de espectrometría de masas se ha demostrado la presentación natural por moléculas HLA de estos péptidos en muestras de cáncer de pulmón primario humano (véanse ejemplo 1).

Se ha demostrado que el gen o proteína originarios (también denominados «proteína entera» o «proteína subyacente») de la que derivan los péptidos están altamente sobreexpresados en el carcinoma de pulmón amicrocítico, y en el caso de las SEQ ID N.º 66 a 75 en el cáncer gástrico y en el glioblastoma en comparación con tejidos normales (véase ejemplo 2 y figura 2 para el NSCLC) lo que demuestra el alto grado de asociación con el tumor de los genes originarios. Además, los propios péptidos están fuertemente sobrepresentados en el tejido tumoral pero no en los tejidos normales (véanse ejemplo 3 y figura 3). .

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T destruyen las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej. células de cáncer de pulmón que presentan los péptidos derivados.

Los péptidos de la presente invención han demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están sobrepresentados y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención (véanse ejemplo 4 y figura 4). Asimismo, cuando los péptidos están acomplejados con el MHC correspondiente pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención también. 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 ácido 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 en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

Las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Tal y como se utiliza aquí, una «sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico» hace referencia a un derivado de los péptidos revelados en el que el péptido se modifica elaborando 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 tiene un grupo $–NH_2$ neutro), lo que implica la reacción con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados para preparar sales ácidas incluyen tanto los ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, malónico, succínico, maléico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinnámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico y similares, como también los inorgánicos, como por ejemplo clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares. A la inversa, las sales básicas de fracciones ácidas que pueden estar presentes en un péptido se preparan utilizando una base aceptable desde el punto de vista farmacéutico, como por ejemplo 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).

Además de su utilidad para el tratamiento del cáncer, los péptidos de la presente invención también son útiles con fines diagnósticos. Debido a que los péptidos se generaron a partir de *células de cáncer de pulmón* y a que se determinó que no estaban o que estaban presentes en cantidades inferiores en los tejidos normales, estos péptidos pueden usarse para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los péptidos reivindicados en biopsias de tejidos puede ayudar al patólogo en el diagnóstico del cáncer. El patólogo puede saber si el tejido es maligno o está inflamado o afectado en general por medio de la detección de determinados péptidos con anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos por los expertos en la materia. La presencia de grupos de péptidos puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos afectados.

La detección de péptidos en muestras de tejido enfermo permite decidir acerca del beneficio de terapias que impliquen al sistema inmunitario, especialmente si se sabe o se espera que los linfocitos T intervengan en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo bien conocido mediante el cual las células malignas o infectadas escapan a la vigilancia del sistema inmunitario. De esta forma, la presencia de los péptidos demuestra que las células analizadas no hacen uso de este mecanismo.

Los péptidos de la presente invención pueden utilizarse para analizar las respuestas de los linfocitos contra dichos péptidos, como las respuestas de los linfocitos T o de los anticuerpos contra el péptido o el péptido unido a moléculas MHC. Estas respuestas linfocitarias pueden usarse como marcadores de pronóstico para decidir las siguientes etapas de la terapia. Estas respuestas también pueden usarse como marcadores indirectos en enfoques inmunoterapéuticos dirigidos a inducir respuestas de linfocitos por medios distintos, como, por ejemplo, mediante vacunación con proteínas, ácidos nucleicos, material autólogo o la transferencia de linfocitos a un receptor. En la terapia

génica, las respuestas de los linfocitos contra los péptidos se pueden tener en cuenta en el momento de valorar los efectos secundarios. La monitorización de las respuestas de los linfocitos también puede ser una herramienta valiosa en los estudios de seguimiento de terapias de trasplante como, por ejemplo, para detectar las enfermedades de injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.

Los péptidos de la presente invención pueden usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden ser utilizados como terapia para dirigir 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 modificado genéticamente 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.

Existe otro aspecto más de la presente invención relacionado con un método para producir dicho antígeno 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 modificado genéticamente que comprende células que expresan 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 que forma un complejo con 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 puede unirse específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II formando un complejo con dicho antígeno restringido a HLA. Métodos pertinentes para la producción de tales anticuerpos y de complejos mayores de histocompatibilidad de clase I monocatenarios, así como de otras herramientas para la producción estos anticuerpos se revelan en WO 03/068201, WO

2004/084798,WO 01/72768, WO 03/070752, y en Cohen CJ, Denkberg G, Lev A, Epel M, Reiter Y. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. J Mol Recognit. 2003 Sep-Oct;16(5):324-32. ; Denkberg G, Lev A, Eisenbach L, Benhar I, Reiter Y. Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody with TCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen. J Immunol. 2003 Sep 1;171(5):2197-207; y en Cohen CJ, Sarig O, Yamano Y, Tomaru U, Jacobson S, Reiter Y. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. J Immunol. 2003 Apr 15; 170(8):4349-61, que a efectos de la presente invención se incorporan explícitamente como referencia en su integridad.

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

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un receptor de linfocito T soluble 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 mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar un fagoteca (US 2010/0113300, Liddy N, Bossi G, Adams KJ, Lissina A, Mahon TM, Hassan NJ, et al. Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing. *Nat Med* 2012 Jun;18(6):980-987). 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 de sulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (véanse Boulter JM, Glick M, Todorov PT, Baston E, Sami M, Rizkallah P, et al. Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. Protein Eng 2003 Sep;16(9):707-711. ; Card KF, Price-Schiavi SA, Liu B, Thomson E, Nieves E, Belmont H, et al. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. Cancer Immunol Immunother 2004 Apr;53(4):345-357; y Willcox BE, Gao GF, Wyer JR, O'Callaghan CA, Boulter JM, Jones EY, et al. Production of soluble alphabeta T-cell receptor heterodimers suitable for biophysical analysis of ligand binding. Protein Sci 1999 Nov; 8 (11):2418-2423). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase 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 aparece descrita una combinación de TCR solubles. Otros métodos de producción se revelan en WO 2013/057586A1.

Además, se pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

Para seleccionar los péptidos sobrepresentados se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación mediana de la muestra así como la variación de los duplicados.

El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con muestras de tejido normal de referencia. Cada uno de esos perfiles se puede después consolidar en una puntuación de sobrepresentación calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, Sarkar D., R Core team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. 2008) adjusting for multiple testing by False Discovery Rate (Y. Benjamini and Y. Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), Vol. 57 (No. 1):289-300, 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 NSCLC 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 la presentación natural de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de pacientes con NSCLC.

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 marcaje con los datos adquiridos de CL-EM procesados con una plataforma de análisis de datos patentada que combina algoritmos para identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

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

Se purificaron los complejos HLA-péptido procedentes de 50 muestras de tejido tumoral de NSCLC criogenizadas, se aislaron los péptidos asociados a HLA y se analizaron con CL-EM.

Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de tumores primarios de NSCLC para confirmar su presentación en el NSCLC primario.

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos tumorales NSCLC y normales se cuantificaron con recuento iónico de los datos de CL-EM sin marcaje. El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Todas las señales cuantitativas producidas por cada péptido

en varios experimentos de CL-EM se normalizaron con medidas de tendencia central, se promediaron por muestra y se combinaron en un diagrama de barras, llamado perfil de presentación. El perfil de presentación combina diversos métodos de análisis como la búsqueda en bases de datos de proteínas, agrupación de espectros, deconvolución del estado de carga (descarga) y alineamiento del tiempo de retención y normalización.

La presente invención se refiere por tanto a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, y SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, y SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, y SEQ ID No. 92.

La presente invención se refiere además a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, y SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, y SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, y SEQ ID No. 92, en que dicho péptido tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 14 aminoácidos para un péptido que comprende SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 78 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92, y de entre 12 y 30 aminoácidos para un péptido que comprende SEQ ID No. 76 o SEQ ID No. 77.

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

La presente invención se refiere además a los péptidos conformes a la invención en que dichos péptidos consisten o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92.

La presente invención se refiere además a los péptidos conformes a la invención, en que dicho péptido está modificado y/o incluye enlaces no peptídicos.

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

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

La presente invención se refiere además al ácido nucleico conforme a la invención que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos.

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

La presente invención se refiere además a un péptido conforme a la invención, a un ácido nucleico conforme a la invención o a un vector de expresión conforme a la invención para el uso en medicina.

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

La presente invención se refiere además a la célula hospedadora conforme a la invención que es una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere además a la célula hospedadora conforme a la invención en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

La presente invención se refiere además a un método para la producción de un péptido conforme a la invención, comprendiendo dicho método el cultivo de la célula hospedadora descrita y el aislamiento del péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere además a un método *in vitro* para la producción de linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, comprendiendo el método la puesta en contacto *in vitro* de CTL con moléculas MHC de clase I o II humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar dicho CTL de una manera específica del antígeno, en que dicho antígeno es cualquier péptido conforme a la invención.

La presente invención se refiere además al método descrito, en que dicho antígeno se carga en moléculas MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada poniendo en contacto una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere además al método conforme a la invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92.

La presente invención se refiere además a linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, producidos por el método conforme a la invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos descrita.

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 dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T citotóxicos (CTL) conforme a la invención.

La presente invención se refiere además al uso de cualquier péptido conforme a la invención, un ácido nucleico conforme a la invención, un vector de expresión conforme a la invención, una célula conforme a la invención, o un linfocito T citotóxico activado conforme a la invención como medicamento o en la fabricación de un medicamento.

La presente invención se refiere además al uso conforme a la invención, en que dicho medicamento es una vacuna.

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

La presente invención se refiere además a un uso conforme a la invención en que dichas células cancerosas son células de cáncer de pulmón, gástrico, gastrointestinal, colorrectal, páncreas o riñón.

La presente invención se refiere además a unas proteínas marcadoras y biomarcadores particulares que pueden ser utilizados para el pronóstico del cáncer de pulmón.

Además, la presente invención se refiere al uso de nuevas dianas descritas de conformidad con la presente invención 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 fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de moléculas de inmunoglobulina, siempre que exhiban cualquiera de las propiedades deseadas (p. ej. la unión específica de un polipéptido marcador de cáncer de pulmón, liberación de una toxina en una célula de cáncer de pulmón que exprese en un nivel elevado un gen marcador del cáncer de pulmón, y/o inhibir la actividad de un polipéptido marcador del cáncer de pulmón) 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 los polipéptidos marcadores del cáncer de pulmón enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la invención se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural o se puede producir con técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un ADNc que codifique ABCA13, MMP12, DST, MXRA5, CDK4, HNRNPH, TANC2, 1RNF213, SMYD3 y SLC34A2, o cualquier otro polipéptido de las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92, o un 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 la cual se purificará una proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador del cáncer de pulmón 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, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988, new 2nd edition 2013). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con pruebas ELISA, Western blot, tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer de pulmón congelados o fijados en formol. Después de la caracterización *in vitro* inicial, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínico 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 como referencia).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En dichos métodos un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que estimula a los linfocitos que produce o que se capaces de producir anticuerpos que se unen 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 de papaína aparecen descritos en WO 94/29348, publicada el 22 de diciembre de 1994 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 Fe. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento dotado de dos sitios de unión a antígeno, pese a lo cual es capaz de unirse al antígeno.

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 biolongevidad, 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 mutagénesis 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 mutagénesis 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 inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o 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 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 casi todas 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, a un anticuerpo humanizado se le introducen 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 la o las secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (Pat. 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 CDR y posiblemente algunos residuos 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 deleción 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 Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución oscile 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, paciente o células mediante inyección (intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, etc.), o con otros métodos como la infusión que aseguren su liberación 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 sólo puede oscilar entre 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los susodichos factores. Tras la administración del anticuerpo como tratamiento contra el cáncer de pulmón, su eficacia 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 de pulmón 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 de pulmón.

Como los marcadores tumorales de pulmón ABCA13 y MMP12 de la invención se expresan mucho en las células de cáncer de pulmón y se expresan poquísimo en las células normales, la inhibición de la expresión de ABCA13 y MMP12 o de la actividad de sus polipéptidos se puede integrar en cualquier estrategia terapéutica para el tratamiento o la prevención del NSCLC.

El principio de la terapia antisentido se basa en la hipótesis de que es posible suprimir la expresión génica de secuencias específicas (ya sea por vía transcripcional o traduccional) mediante la hibridación en el interior de la célula del ADN genómico o del ARNm con una molécula antisentido complementaria a ellos. La formación de ese ácido nucleico bicatenario híbrido trastoca la transcripción del ADN genómico que codifica el antígeno tumoral que constituye la diana, o altera el procesamiento/transporte/traducción y/o estabilidad del ARNm del antígeno tumoral diana.

Los ácidos nucleicos antisentido se pueden hacer llegar a las células con diversas estrategias. Por ejemplo, a un sujeto se le pueden administrar directamente oligonucleótidos antisentido o ARN antisentido (p. ej., por inyección intravenosa) de una forma que les permitan ser absorbidos por las células tumorales. Otra alternativa consiste en la introducción en células *in vivo* de vectores virales o plasmídicos que codifiquen ARN antisentido (o fragmentos de ARN). Los efectos antisentido también se pueden inducir con secuencias codificantes, pero la magnitud de los cambios fenotípicos es muy variable. Los cambios fenotípicos inducidos por la terapia antisentido se valoran en función de los cambios en, p. ej. las concentraciones del ARNm diana, concentraciones de la proteína diana y/o niveles de actividad de dicha proteína.

En un ejemplo concreto, la inhibición de la función del marcador tumoral pulmonar con terapia génica antisentido se puede lograr con la administración directa de ARN antisentido del marcador tumoral pulmonar a un sujeto. El ARN antisentido del marcador tumoral se puede producir y aislar con una técnica estándar, pero se produce más fácilmente con la transcripción *in vitro* utilizando un ADNc antisentido del marcador tumoral controlado con un promotor eficiente (p. ej. el promotor de T7). La administración a células del ARN antisentido del marcador tumoral se puede efectuar con cualquiera de los métodos de administración directa de ácidos nucleicos descritos a continuaciónN.

Una estrategia alternativa para inhibir la función del ABCA13 y de la MMP12 con terapia génica consiste en utilizar la expresión intracelular de un anticuerpo anti-ABCA13, MMP12 o una porción de un anticuerpo anti-ABCA13, MMP12. Por ejemplo, el gen (o fragmento de gen) que codifica un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de ABCA13, MMP12 y que inhibe su actividad biológica se sitúa bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora específica (p. ej. específica de tejido o de tumor), dentro de un vector de expresión de ácidos nucleicos. El vector se administra a continuación al sujeto de tal modo que es asimilado por las células de cáncer de pulmón u otras células, que segregarán los anticuerpos anti-ABCA13, MMP12 y bloquearán la actividad biológica de los polipéptidos ABCA13 y MMP12. Preferentemente, los polipéptidos ABCA13 y MMP12 están presentes en la superficie extracelular de células de cáncer gástrico.

En los métodos susodichos, que incluyen la administración y la absorción de ADN exógeno por las células del sujeto (transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar incorporados en un vector en forma de ADN o de ácidos nucleicos desnudos para suministrar los ácidos nucleicos a las células para inhibir la expresión de la proteína marcadora del tumor gástrico. El vector puede estar disponible en una preparación comercial, como un vector adenovírico (Quantum Biotechnologies Inc., Laval, Quebec, Canadá). La liberación del ácido nucleico o del

vector en las células se puede materializar a través de varios mecanismos. Como ejemplo, puede ser a través de liposomas con preparaciones comerciales de liposomas como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-25 BRL, Inc., Gaithersburg, Md., EE. UU.), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis., EE. UU.), así como otros liposomas desarrollados según los procedimientos habituales en la técnica. Asimismo, el ácido nucleico o el vector de esta invención se pueden suministrar *in vivo* mediante electroporación, una tecnología que ofrece Genetronics, Inc. (San Diego, Calif., EE. UU.) o mediante un aparato SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Arizona, EE. UU.).

Como ejemplo, el vector puede ser un sistema viral, como un sistema de vector retrovírico que puede encapsidar un genoma retrovírico recombinante. El retrovirus recombinante infecta las células y con ello inocula un ácido nucleico antisentido que inhibe la expresión de ABCA13, MMP12. El método exacto para introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero no se limita al uso de vectores retrovíricos. Existen otras técnicas comunes para llevar a cabo este procedimiento, tales como vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores lentivíricos, vectores retrovíricos seudotipados. También se pueden utilizar técnicas de transducción física, como liposomas y a través de receptores y otros mecanismos de endocitosis. La presente invención se puede utilizar en conjunción con cualquiera de estos y de otros métodos usuales de transferencia génica.

Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionucleótido (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{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 ABCA13, MMP12 y el valor de afinidad (Kd) es inferior a 1 x 10 μM.

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 espectroscopia; 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 ABCA13, MMP12.

La presente invención proporciona pues un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, y SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, y SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, y SEQ ID No. 92.

Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I y/o 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. Bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX y otras herramientas de análisis.

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 (Fong et al., 2001); (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay et al., 2006).

Por «variante» de la secuencia de aminoácidos los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos indicadas en las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, y SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, y SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, y SEQ ID No. 92. 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 CTL activados.

Estos CTL 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 (Rammensee et al., 1997) y de las bases de datos científicas (Rammensee et al., 1999), 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 No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92, 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 CTL activados, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención.

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 4: Variantes y motivo de los péptidos según las SEQ ID N.º 1, 2, 4, 5 y 7

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MMP12-003	Código del péptido		K	I	Q	E	M	Q	H	F	L
SEQ ID No.	Variantes			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							
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DST-001	Código del péptido		N	L	I	E	K	S	I	Y	L
SEQ ID No.	Variantes										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
CDK4-001	Código del péptido		T	L	W	Y	R	A	P	E	V
SEQ ID No.	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

También pueden ser adecuados péptidos más largos. Asimismo es posible generar epítopos de MHC de clase I, que aunque suelen tener entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, mediante el procesamiento peptídico de péptidos más largos o proteínas que incluyan el epítopo en cuestión. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítopo de interés sean residuos que no afecten sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epítopo durante el procesamiento.

En consecuencia, la presente invención también proporciona péptidos y variantes de epítopos 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 33 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. La unión de un péptido o una variante a un complejo MHC se puede analizar con métodos conocidos en la técnica.

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 No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92.

Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a cualquiera de las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92 o una variante de las mismas contiene segmentos adicionales de aminoácidos en los extremos N- y/o C-terminal que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un epítopo para el epítopo de moléculas MHC.

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

Asimismo, el péptido o variante pueden ser modificados más para mejorar la estabilidad y/o la unión a las moléculas MHC con objeto de desencadenar una respuesta inmunitaria más potente. En la técnica se conocen métodos para ese tipo de optimización de la secuencia peptídica, entre ellos, por ejemplo, la introducción de enlaces peptídicos inversos o de enlaces no peptídicos.

En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace está invertido. Estos seudopéptidos de tipo

retro-inverso se pueden sintetizar con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos por Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, incorporado a la presente memoria como referencia. Esta estrategia implica sintetizar seudopéptidos que contengan cambios que afectan al esqueleto principal pero no a la orientación de las cadenas laterales. Meziere et al. (1997) demuestran que estos seudopéptidos son útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH y son mucho más resistentes a la proteólisis.

Ejemplos de enlaces no peptídicos son: $-CH_2-NH$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ y $-CH_2SO-$. La patente de EE. UU. 4. 897. 445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos ($-CH_2-NH$) en cadenas polipeptídicas que implica la síntesis de polipéptidos con procedimientos ordinarios y la síntesis del enlace no peptídico con la reacción de un aminoaldehído con un aminoácido en presencia de $NaCNBH_3$.

Péptidos que comprenden las susodichas secuencias se pueden sintetizar con grupos químicos adicionales en sus extremos amino y/o carboxilo con el fin de mejorar su estabilidad, biodisponibilidad y/o afinidad. Por ejemplo, a los extremos amino de los péptidos se les pueden añadir grupos hidrofóbicos como carbobenzoxilo, dansilo o t-butiloxicarbonilo. De modo similar, se puede colocar en los extremos amino de los péptidos un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo. Además a los extremos carboxilo de los péptidos se les pueden añadir un grupo hidrofóbico, el t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido.

Además, los péptidos de la invención pueden ser sintetizados de tal forma que se altere su configuración estérica. Por ejemplo, se puede utilizar el D-isómero de uno varios residuos de aminoácido del péptido en lugar del L-isómero habitual. Y todavía más, se puede sustituir al menos uno de los residuos de aminoácido de los péptidos de la invención por uno de los consabidos aminoácidos no presentes en la naturaleza. Alteraciones de ese tipo pueden servir para mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la capacidad de unión de los péptidos de la invención.

De forma similar, un péptido o variante de la invención puede ser modificado químicamente haciendo reaccionar aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y se resumen p. ej. en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005, que se incorpora en la presente memoria como referencia. La modificación química de aminoácidos incluye, entre otros tipos, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductiva, trinitrobenzilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), modificación amida de los grupos carboxilo y modificación del grupo sulfhidrilo mediante oxidación con ácido perfórmico para transformar la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, relación con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato en pH alcalino, sin limitación a los anteriores. A este respecto, se remite a la persona versada en la técnica al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) donde podrá obtener una metodología más extensa en relación con la modificación química de proteínas.

En resumen, la modificación de p. ej. los residuos arginilos de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilglioxal, 2,3-butanediona, y 1,2-ciclohexanediona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción de 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 α-amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etilen)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas.

Los residuos de metionina de las proteínas se pueden modificar por ejemplo con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.

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

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

La modificación de proteínas y de péptidos terapéuticos con PEG prolonga a menudo la semivida en circulación, mientras que la conjugación de proteínas con glutaraldehido, polietilenglicol diacrilato y formaldehido por medio de enlaces cruzados se emplea para la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos destinados a inmunoterapia se efectúa a menudo con la carbamilación con cianato de potasio.

Un péptido o variante que está modificado o que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, se pueden sintetizar péptidos y variantes (al menos las que contienen enlaces peptídicos que unen residuos de aminoácidos) con la síntesis peptídica Fmoc-poliamida en fase sólida, tal y como muestran Lu et al (1981) y las referencias incluidas en el mismo. La protección

provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (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 butiloxicarbonílicos (en la lisina y la histidina), derivados tritilados (en la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrilo 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), bisacriloiletilendiamina (entrelazante) y acriloilsarcosina 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-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son 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 (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido.

La purificación se puede practicar con una técnica o una combinación de técnicas como recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbicaa y, normalmente, cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, por ejemplo con elución con gradiente de acetonitrilo/agua.

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

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo un polinucleótido) que codifica un péptido o una variante peptídica de la invención. El

polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos, monocatenarios y/o bicatenarios, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como por ejemplo, polinucleótidos con un esqueleto de fosforotioato y que pueden contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, el polipéptido solo puede codificar péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales. 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 diversos sitios 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 et al., 1988)). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo diseñando los sitios de restricción adecuados, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la invención puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las reveladas 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 adecuada y el marco de lectura correcto para posibilitar la expresión. Si es preciso el ADN se puede unir a secuencias de nucleótidos de control que regularán la transcripción y la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque el vector de expresión ya suele incorporar tales controles. A continuación el vector se

introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. En general, el vector no consigue transformar todos los hospedadores, lo que hará necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan quedado transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como por ejemplo de resistencia a antibióticos.

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

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

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

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

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 están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas por ejemplo en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols», Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas versadas en la materia.

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véanse por ejemplo Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, y Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. La transformación de células de levadura aparece descrita en Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. El método de Beggs (1978) Nature 275,104-109 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 transfeccion 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 ácido prostático fosfatasa (PAP) son en la actualidad objeto de investigación como tratamiento contra el cáncer de próstata (Sipuleucel–T) (Small et al., 2006; Rini 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 expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante se pueden preparar para ser administrados por inyección intravenosa (i. v.), inyección subcutánea (s. c.), inyección intradérmica (i. d.), inyección intraperitoneal (i. p.), inyección 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. Se pueden administrar dosis de péptido o de ADN de por ejemplo entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente 125 µg a 500 µg, dependiendo del péptido o ADN de que se trate. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter et al Nature Medicine 18, 1254–1261 (2012)).

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 durante un periodo de 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.

Preferentemente la célula de mamífero carece o presenta un nivel o función reducida del transportador de péptidos TAP. 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 Karre et al 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 epítopo de MHC de clase I, los linfocitos T son CTL CD8-positivos.

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítopo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92.

Existen otros métodos para generar CTL *in vitro*. Por ejemplo, los métodos descritos en Peoples et al (1995) y Kawakami et al (1992) emplean linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al (1995) recurre a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de los CTL. Jochmus et al (1997) describen la producción de CTL autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. Hill et al (1995) y Jerome et al (1993) emplean linfocitos B para la producción de CTL autólogos. Asimismo, para la preparación de CTL autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter et al. 2003 describe la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En este estudio, 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 células T2, para presentar antígenos se pueden usar otras células tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras, células diana infectadas con vaccinia. Asimismo se pueden utilizar virus vegetales (véase por ejemplo Porta et al (1994)) que describe el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños.

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

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92.

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 le se administran al paciente pueden proceder de él mismo y ser activados del modo antes descrito, es decir, son 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 analizada se le detecte.

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 en un paciente cuyas células diana 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 en la técnica. Se pueden encontrar revisiones en (Gattinoni et al., 2006) y (Morgan et al., 2006).

Cualquier molécula de la invención, ya sea péptido, ácido nucleico, anticuerpo, vector de expresión, célula, CTL activado, receptor de linfocito T o el ácido nucleico que los 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.

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es una vacuna. Puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o sistémicamente por vía i. d., i. m., s. c., i. p. e i. v., o aplicarse *ex vivo* en células derivadas del paciente o de una estirpe celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente, al que luego se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que las células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras como la interleucina-2. El péptido puede ser esencialmente puro o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o puede ser utilizado en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o ser administrado con un sistema de liberación adecuado como, por ejemplo, liposomas. El péptido también se puede conjugar con un vehículo apropiado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y Longenecker, 1993). El péptido también podrá estar etiquetado, o ser una proteína de fusión o una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se revela en la presente invención estimulen los linfocitos T CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de los CTL CD8 es más eficiente si cuenta con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así, para epítopos de MHC de clase I que estimulan los CTL CD8, las secciones o la pareja de fusión de una molécula híbrida proporciona de forma adecuada epítopos que estimulan a los linfocitos T $CD4^+$. Los epítopos estimuladores de CD4 y CD8 son conocidos en la materia e incluyen a 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 No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente 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.

En otro aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 a SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 76 a SEQ ID No. 84, o SEQ ID No. 92 y al menos un péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y como más preferible 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.

El polinucleótido puede ser básicamente puro, o estar contenido en un vector o un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o

una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Se puede consultar una revisión general por ejemplo en (Pascolo 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 ADN y/o ARN viral, como los basados en adenovirus, virus vaccinia, retrovirus, herpesvirus, virus adenoasociados o híbridos que contengan elementos de más de un virus. Los sistemas de liberación no víricos como lípidos catiónicos y polímeros catiónicos son conocidos por los entendidos en la materia. También se pueden utilizar métodos físicos como una «pistola génica». El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítopo 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 CTL y linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, y podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, 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 basadas en 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 Ribi, 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; Allison and Krummel, 1995). También se pueden usar citocinas. Diversas citocinas se han vinculado directamente con la influencia en la migración de las células dendríticas a los tejidos linfoides (p. ej. TNF-), la aceleración de la maduración de las células dendríticas en células presentadoras de antígeno eficientes para los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (N. º Pat. EE. UU. 5. 849. 589, incluida íntegramente en la presente memoria) y que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich, 1996).

También se sabe que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en el entorno de una vacuna. Sin quedar restringido a consideraciones teóricas, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores *toll-like* (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 impulsada por CpG potencia las respuestas celular y humoral específicas de antígeno frente a una amplia variedad de antígenos, incluyendo antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas

de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos en vacunas tanto profilácticas como terapéuticas. Más destacable aún es el hecho de que potencia la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo que da como resultado una mayor activación de las células T_{H1} y una fuerte generación de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. El sesgo hacia T_{H1} inducido 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 tienden a decantar la respuesta hacia T_{H2}. Los oligonucleótidos de CpG muestran una actividad adyuvante aún mayor cuando se formulan o se administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones lipídicas 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 que las dosis de antígeno se reduzca en dos órdenes de magnitud, aproximadamente, con respuestas de anticuerpos comparables a las de la dosis completa de vacuna sin CpG en algunos experimentos (Krieg, 2006). La patente de Estados Unidos N.º 6. 406. 705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para estimular 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 es posible utilizar otras moléculas de unión a TLR como ARN que se une a los 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 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, sildenafilo, 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. El experto en la materia puede determinar fácilmente las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención sin necesidad de experimentación excesiva.

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

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

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

En una 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 se destina a la administración por vía parenteral como, por ejemplo, subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien por vía oral. Para ello, los péptidos y, opcionalmente, otras moléculas son disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable y preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes como soluciones tamponadoras, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, aromas, lubricantes, etc. Los péptidos también pueden administrase junto con sustancias estimulantes de la respuesta inmunitaria, como las citocinas. Una lista completa de excipientes utilizables para esta composición aparece, por ejemplo, en A. Kibbe, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3ª Ed., 2000, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. La composición puede usarse para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2113253, por ejemplo.

No obstante dependiendo del número y de las características fisicoquímicas de los péptidos de la invención se precisa más investigación para ofrecer formulaciones con ciertas combinaciones de péptidos, en especial combinaciones con más de 20 péptidos que sean estables durante más de 12 a 18 meses.

La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular carcinoma de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, carcinoma de células renales, cáncer de colon, adenocarcinoma, cáncer de próstata, neoplasia benigna y melanoma maligno.

La presente invención también contempla un equipo que comprende:
(a) un contenedor con una composición farmacéutica como la descrita más arriba, en forma de solución o liofilizada;
(b) opcionalmente, un segundo contenedor con solución reconstituyente o diluyente para la formulación liofilizada; y
(c), opcionalmente, instrucciones de (I) uso de la solución o de (II) reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

El equipo puede constar, además, de uno o varios (III) tampones, (IV) diluyentes, (V) filtros, (VI) agujas o (v) jeringuillas. Se prefiere que el contenedor sea un frasco, un vial, una jeringuilla o un tubo de ensayo; puede ser multiuso. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

Los equipos de la presente invención comprenden, preferiblemente, una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Entre los contenedores apropiados se incluyen, por ejemplo, frascos, viales (viales de cámara doble, p. ej.), jeringuillas (como jeringuillas de cámara doble) y tubos de ensayo. El contenedor puede estar hecho de una variedad de materiales, como vidrio o plástico. Se prefiere que el equipo y/o el contenedor disponga(n) de instrucciones relacionadas con el contenedor que indiquen cómo

utilizarlos y/o realizar la reconstitución. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener las concentraciones de péptido descritas más arriba. La etiqueta también puede indicar que la formulación es útil o está destinada para su administración subcutánea.

El recipiente que contenga la formulación puede ser un vial multiuso, lo que permite administraciones repetidas (de 2 a 6 administraciones, p. ej.) de la formulación reconstituida. El equipo puede constar, además, de un segundo contenedor que comprenda un diluyente adecuado (por ejemplo, una solución de bicarbonato sódico).

Al mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de péptidos en la formulación reconstituida es, preferiblemente, de al menos 0,15 mg/ml/péptido (= 75 µg) y, preferiblemente, no mayor de 3 mg/ml/péptido (= 1500 µg). El equipo también puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, como otros tamponadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y folletos con instrucciones de uso.

Los equipos de la presente invención pueden constar de un solo recipiente que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas conforme a la presente invención junto con otros componentes o sin ellos (por ejemplo, otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos), o, por el contrario, pueden constar de recipientes distintos para cada uno de los componentes.

Preferiblemente, los equipos de la invención incluyen una formulación de la invención embalada para su uso en combinación con la administración conjunta de un segundo compuesto (como adyuvantes [p. ej., GM-CSF], un agente quimioterapéutico, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor de la angiogénesis, un agente de inducción de apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de la misma. Los componentes del equipo pueden estar previamente combinados o bien cada componente puede estar contenido en un recipiente distinto 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 se pueden proporcionar en forma de sólido, que se podrán convertir en líquidos mediante la adición de disolventes adecuados, que se suministrarán, preferiblemente, en un contenedor distinto.

El contenedor de un equipo terapéutico puede ser un vial, un tubo de ensayo, un matraz, un frasco, una jeringuilla o cualquier otro recipiente que pueda contener un sólido o un líquido. Normalmente, cuando hay más de un componente, el equipo contendrá un segundo vial u otro contenedor, lo que permite la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro recipiente con un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el equipo terapéutico contendrá una serie de aparatos (por ejemplo, una o varias agujas, jeringuillas, cuentagotas, pipetas, etc.) que permitan la administración de los agentes de la invención que componen el presente equipo.

La formulación farmacéutica de la presente invención es aquella adecuada para la administración de los péptidos por cualquier vía adecuada como la oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Se prefiere la administración subcutánea y, con mayor preferencia, la intradérmica. Se puede utilizar una bomba de infusión para la administración.

Puesto que los péptidos de la invención proceden del cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), el medicamento de la invención debe utilizarse preferentemente para tratar ese tipo de cáncer. En una forma de realización preferida, puesto que los péptidos derivados de ABCA13 y de MMP12 se aislaron del cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), el medicamento de la invención debe utilizarse preferentemente para tratar ese tipo de cáncer.

Los péptidos con las secuencias SEQ ID N.º. 78 a 92 también se aislaron del carcinoma de células de Merkel, y por tanto pueden ser utilizados para tratar ese tipo de carcinoma.

Ahora se describirá la presente invención con los ejemplos siguientes que muestran las formas de realización preferidas de la misma a título ilustrativo, 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 íntegramente a modo de referencia.

Descripción breve de los dibujos

Figure 2: Perfiles de expresión de ARNm de proteínas seleccionadas en muestras de tejidos normales y en 21 muestras de cáncer de pulmón
a) ABCA13 (Probeset ID: 1553605_a_at)
b) MMP12 (Probeset ID:204580_at)

Figura 3: Perfiles de presentación de péptidos HLA de clase I seleccionados. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que exponía la presentación media de la muestra así como las variaciones de los duplicados. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con muestras de tejido normal de referencia.
b) DST-001

Figura 4: Ejemplos de resultados de la inmunogenicidad *in vitro* específica de péptido de TUMAP de clase I. Linfocitos T CD8+ específicos se tiñeron con multímeros HLA unidos a dos fluorocromos distintos. Los diagramas de puntos revelan las poblaciones de multímero MHC-doble-positivo para el péptido estimulado (cuadros de la izquierda) y la correspondiente estimulación del control negativo (cuadros de la derecha).

Figura 5: Propiedades de unión de POSTN-002 y MMP12-002 a los haplotipos HLA investigados: El diagrama muestra las puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 a los 6 haplotipos HLA-DR analizados.

Figura 6: Estabilidad de los complejos HLA-POSTN-002 y MMP12-002 después de 24 h a37°C:El diagrama muestra los cocientes de las puntuaciones de unión detectados a las 0 h y después de 24 h a 37°C de POSTN-002 y de MMP12-002 con la molécula HLA correspondiente.

Figure 7: Ejemplo de respuesta de los linfocitos T CD4 generada por la vacuna contraCEA-006 en un ensayo de tinción intracelular de citocinas (ICS) con la clase II. Después de la sensibilización *in vitro* se analizaron PBMC del paciente 36-031 para detectar las respuestas de los linfocitos T CD4 contra el antígeno CEA-006 (cuadro

superior) y otro ficticio (cuadro inferior) en el momento combinado V8/FdE. Las células fueron estimuladas con los péptidos correspondientes y teñidas con marcadores de vialidad, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 y efectores (de derecha a izquierda: CD154, TNF-alfa, IFN-gama, IL-2, IL-10), respectivamente. Los linfocitos T CD4 viables fueron analizados para determinar la proporción de células positivas para una o varias moléculas efectoras.

Figura 8: Inmunogenicidad de varios péptidos de clase II: El diagrama muestra la tasa de respuesta inmunitaria a 5 péptidos de clase II distintos detectados en 16 pacientes en el caso de los péptidos IMA950 y en 71 pacientes en el de los péptidos IMA910 en un ensayo de tinción intracelular de citocinas.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1:

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes fueron facilitados por la Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y permanecieron a -80ºC 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, K., 1991; Seeger, F. H. T., 1999) 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.

Métodos

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase invertida (sistema Acquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm d. i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida C18 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 nanoESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se hizo operar 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 marcaje se efectuó por recuento iónico, es decir por extracción y análisis de las características CL-EM (Mueller et al. 2007a). El método supone que el área de la señal del péptido en la CL-EM está relacionada con su abundancia en la muestra. La características extraídas se procesaron además con deconvolución del estado de carga y alineamiento del tiempo de retención (Mueller et al. 2007b; 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 variacion entre los duplicados técnicos y biológicos. De ese modo cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo, todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra así como las variaciones de los duplicados. El perfil yuxtapone muestras de NSCLC con muestras de tejido normal de referencia.

En la figura 3 se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrepresentados a modo de ejemplo.

EJEMPLO 2

Perfiles de expresión de genes que codifican los péptidos de la invención
No todos los péptidos identificados como presentes en la superficie de las células tumorales a través de las moléculas MHC son adecuados para la inmunoterapia, porque la mayoría de ellos proceden de proteínas celulares normales que se expresan en multitud de tipos de células. Muy pocos de esos péptidos están asociados a tumores y probablemente sean capaces de estimular los linfocitos T con una alta especificidad de reconocimiento contra el tumor del cual derivan. A fin de descubrir esos péptidos y de minimizar el riesgo de que la vacuna genere autoinmunidad los inventores se centraron en los péptidos derivados de proteínas que aparecen sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con la mayoría de los tejidos normales.

El péptido ideal sería el derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no esté presente en ningún otro tejido. Para identificar los péptidos que derivaban de genes dotados con un perfil de expresión similar al ideal los péptidos identificados se asignaron a las proteínas y después a los genes originarios y se generaron los perfiles de expresión de dichos genes.

Fuentes de ARN y preparación
Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por la Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania (véase Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se criogenizaron 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 purificaron

con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

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

Experimentos 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, CA, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2. 0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2. 0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes por defecto 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 de riñón normal se ajustó de forma arbitraria en 1,0.

En la Fig. 2 se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios de la presente invención que aparecen muy sobreexpresados o se expresan exclusivamente en el carcinoma de pulmón amicrocítico.

EJEMPLO 4

Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos del NSCLC presentados por MHC de clase I

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención llevamos a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de linfocitos T basado en estimulaciones reiteradas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De ese modo hemos podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 9 TUMAP restringidos al HLA-A*0201 de la invención, lo cual prueba que estos péptidos son epítopos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en el ser humano (Tabla 4).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

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

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

La fabricación de las microperlas tapizadas con pMHC/anti-CD28, la estimulaciones 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.

Todos los complejos pMHC utilizados para cargar las aAPC y en la lectura en el citómetro se fabricaron con el método de intercambio de ligandos del MHC por inducción con UV (Rodenko et al., 2006) con pequeñas modificaciones. Para determinar la cantidad de monómero pMHC obtenida con el intercambio realizamos ensayos ELISA en sándwich con estreptavidina (Rodenko et al., 2006).

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

Los pMHC empleados para la estimulación de los controles positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A/MART-1 modificado) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5), 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 las placas de 96 pocillos incubando simultáneamente $1x10^6$ linfocitos T CD8+ con $2x10^5$ microperlas tapizadas y lavadas con 200 µl de TCM complementado con 5 ng/ml de IL-12 (PromoCell) durante 3-4 días a 37°C. A continuación, la mitad del medio se recambió por TCM fresco complementado con IL-2 80 U/ml y la incubación prosiguió otros 3-4 días a 37°C. Este ciclo de estimulación se efectuó tres veces en total. 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®near IR dye

(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 cada péptido se calcularon como porcentaje del número total de linfocitos 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 comparándola con las estimulaciones del control negativo. El criterio de inmunogenicidad del antígeno dado era el siguiente: detección de al menos un pocillo estimulado *in vitro* evaluable de un donante sano que contuviera una estirpe de linfocitos T CD8+ específicos tras la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contiene como mínimo un 1% de linfocitos T multímero+ específicos entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas es como mínimo 10x la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos del NSCLC

La inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de HLA de clase I estudiados se puede demostrar generando estirpes de linfocitos T específicos para cada péptido. En la Figura 4 se muestran a modo de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de dos péptidos de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 25 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos de HLA de clase I de la invención
Ejemplos de resultados de experimentos de inmunogenicidad *in vitro* realizados por el solicitante con los péptidos de la invención. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 70 %= +++; y > 70 % = ++++

SEQ ID N.º:	Pocillos	Donantes
2	+	++
3	+	++
4	+	++
7	++	++++
8	+	++
9	+	+
10	+	++
11	++	++++ (100%)
15	++	++
16	+	++
19	+	++
18	+	+++
21	++	++
22	+	+++
24	+	++
30	+	++
31	+	+++
32	+	+++
33	+	+++
35	+	++

37	+	++++ (100%)
38	+	++
39	+	++
40	+	++
42	++	++++ (100%)
43	+	+++
44	+	++
45	+	+
46	+	+++
47	+	++
48	+	+
52	+	+
53	++	++
54	+	++
55	+	++
56	++	++++ (100%)
62	++	++++
57	+	++
59	+	+++
60	+++	++++ (100%)
61	+	+++
63	+	++
64	+	+++
65	++	+++
66	+	+++
67	+	++
68	+	+
69	++	+++
70	+	+++
71	+	+++
72	+	+++
73	+	++
74	+	+++
75	+	++
78	++	++
79	+	++++
80	+	++
81	+	++
85	++	++++
86	+	++
87	+	+++
88	+	++
92	+	++

EJEMPLO 5

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida estándar y contrastada con el método de Fmoc. Después de la purificación con RP-HPLC preparativa, se llevó a cabo un procedimiento de intercambio iónico para incorporar contraiones que fueran fisiológicamente compatibles (por ejemplo trifluoroacetato, acetato, amonio o cloruro).

La identidad y la pureza de cada péptido se determinaron con espectrometría de masas y RP-HPLC analítica. Tras el procedimiento de intercambio iónico se obtuvieron los péptidos en forma de liofilizado blanco o casi blanco con una pureza de entre el 90% y el 99,7%.

Todos los TUMAP se administraron preferiblemente como sales de trifluoroacetato o de acetato, aunque también es factible con otros tipos de sales. En las mediciones del ejemplo 4 se utilizaron sales trifluoroacéticas de los péptidos.

EJEMPLO 6

Intercambio de ligandos por UV

Los péptidos candidatos para las vacunas conformes a la presente invención se siguieron analizando para comprobar su inmunogenicidad mediante ensayos de sensibilización *in vitro*. Los diferentes complejos de péptido-MHC necesarios para estos ensayos se produjeron con intercambio de ligandos por UV, técnica en la que un péptido sensible a los rayos UV se escinde tras exponerlo a dicha radiación y se intercambia por el péptido de interés que se pretende analizar. Sólo los candidatos peptídicos que pueden unirse y estabilizar las moléculas de MHC receptoras del péptido evitan la disociación de los complejos MHC. Para determinar el rendimiento de la reacción de intercambio se llevó a cabo un ELISA basado en la detección de la cadena ligera (β2m) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se efectuó siguiendo en líneas generales el modo descrito por Rodenko et al. (Rodenko B, Toebes M, Hadrup SR, van Esch WJ, Molenaar AM, Schumacher TN, Ovaa H. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. Nat Protoc. 2006;1(3):1120-32.).

Placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) se incubaron toda la noche con estreptavidina 2 µg/ml en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4x y se bloquearon durante 30 min a 37°C con un tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Como patrones se emplearon monómeros HLA-A*0201/MLA-001 replegados, en el intervalo de 8-500 ng/ml. Los mónomeros de péptido-MHC resultantes de la reacción de intercambio por UV se diluyeron 100x con tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con anticuerpo anti-β2m conjugado con HRP 2 µg/ml durante 1h a 37°C, se lavaron de nuevo y se revelaron con solución de TMB que se detuvo con NH_2SO_4. La absorción se midió a 450 nm.

Tabla 6: Intercambio de ligandos por UV

SEQ ID N.º	**Nombre del péptido**	**Rendimiento medio del intercambio en %**	**Rendimiento del intercambio**
81	ANKS1A-001	78	++++
87	AURKB-001	54	+++
85	BUB1B-001	59	+++

48	SNRNP20-001	54	+++
80	CEP192-001	56	+++
90	COG4-001	57	+++
89	IFT81-001	57	+++
83	MDN1-001	67	+++
82	CEP250-002	70	+++
91	NCBP1-001	65	+++
92	NEFH-001	50	++
84	OLFM1-001	48	++
86	PI4KA-001	51	+++
11	SLC3A2-001	56	+++
78	SLI-001	47	++
79	TLX3-001	70	+++
2	MMP12-003	57	+++
68	FAP-003	31	++
66	IGF2BP3-001	46	++
4	DST-001	50	++
31	GFPT2-001	43	++
6	DST-002	59	+++
40	MXRA5-002	56	+++
49	SAMSN1-001	47	++
8	HNRNPH-001	26	++
69	WNT5A-001	37	++
15	IL8-001	41	++
50	STAT2-001	69	+++
72	ADAM8-001	67	+++
73	COL6A3-002	81	++++
18	VCAN-001	41	++
12	SMYD3-001	50	++
3	ABCA13-002	36	++
35	BNC1-001	43	++
7	CDK4-001	45	++
19	DROSHA-001	68	+++
33	GALNT2-001	73	++++
13	AKR-001	13	+
39	LAMC2-001	61	+++
56	RAD54B-001	48	++
24	COL12A1-002	55	+++
43	CSE1-001	55	+++
45	SEC61G-001	18	+
47	PCNXL3-001	87	++++
9	TANC2-001	71	++++
70	TPX2-001	56	+++
17	HUWE1-001	45	++
54	TACC3-001	54	+++
32	CERC-001	62	+++
26	SERPINB3-001	47	++
58	CCNA2-001	54	+++

44	DPYSL4-001	77	++++
27	KIF26B-001	68	+++
51	CNOT1-001	57	+++
11	SLC34A2-001	51	+++
30	RGS4-001	49	++
20	VCAN-002	49	++
67	CDC6-001	48	++
74	THY1-001	65	+++
10	RNF213-001	84	++++
61	RCN1-001	75	++++
37	FZD-001	52	+++
71	HMMR-001	49	++
60	C11orf24-001	47	++
53	JUNB-001	51	+++
25	ELANE-001	62	+++
61	RCC1-001	77	++++
62	MAGEF1-001	83	++++
22	ACACA-001	61	+++
21	PLEKHA8-001	47	++
57	EEF2-002	31	++
41	HSP-002	47	++
38	ATP-001	19	+
46	ORMDL1-002	61	+++
59	NET1-001	82	++++
63	NCAPD2-001	76	++++
42	VPS13B-001	63	+++
64	C12orf44-001	34	++
23	ITGA11-001	53	+++
75	DIO2-001	50	++
28	ANKH-001	52	+++
65	HERC4-001	61	+++
16	P2RY6-001	91	++++

Los péptidos candidatos que presentan un rendimiento de intercambio elevado (superior al 40%, preferiblemente superior al 50%, más preferiblemente superior al 70%, y como más preferible superior al 80%) se prefieren en general para la generación y la producción de anticuerpos o de fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o de fragmentos de los mismos, ya que muestran la suficiente avidez hacia las moléculas MHC y evitan la disociación de los complejos MHC.

EJEMPLO 7

Unión e inmunogenicidad de los péptidos de MHC de clase II seleccionados

Las proteínas HLA de clase II se dividen en 3 isotipos principales, a saber, HLA-DR, DP y DQ, que están codificados por numerosos haplotipos. La combinación de varias cadenas α y β aumenta la diversidad de las proteínas HLA de clase II que se encuentran en una población arbitraria. Por tanto, los TUMAP de HLA de clase II seleccionados tienen que unirse a varias moléculas HLA-DR distintas (mostrar una capacidad de unión

promíscua) para ser capaces de contribuir a una respuesta eficaz de los linfocitos T en un porcentaje sustancial de pacientes.

En un ensayo de unión *in vitro* llevado a cabo por un proveedor externo se analizó la unión promíscua de POSTN-002 y de MMP12-002 a varios haplotipos HLA-DR y la estabilidad de los complejos formados del modo indicado a continuación.

Materiales y métodos

Lista de péptidos

N. º de secuencia	ID del péptido	Secuencia	Origen	Tamaño
76	MMP12-002	INNYTPDMNREDVDYAIR	IMA-942	18
77	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	IMA-942	17

Lista de haplotipos HLA-DR investigados

Los 7 haplotipos HLA-DR investigados se han seleccionado conforme a sus frecuencias en una población de norteamericanos HLA-A*02 y HLA-A*24 positivos (Tablas 7.1 y 7.2)

Los datos proceden del análisis de 1,35 millones de voluntarios HLA-tipados registrados en el Programa nacional de donantes de médula ósea de EE. UU. (Mori et al., 1997). La población analizada se dividió en los grupos étnicos siguientes: americanos de raza blanca (N=997.193), afroamericanos (N=110.057), americanos de origen asiático (N=81.139), latinoamericanos (N=100.128) y nativos americanos (N=19.203).

Tabla 7.1 Frecuencias haplotípicas en norteamericanos positivos para el HLA-A*02: Los haplotipos analizados se muestran subrayados en gris.

Haplotipo serológico		**Frecuencia haplotípica [% de individuos positivos para HLA-A*02]**				
HLA-A	**HLA-DR**	**Caucásico**	**Africano**	**Asiático**	**Latino-americano**	**Nativo americano**
2	1	8,8	7,8	3,0	6,1	6,8
2	2	14,9	13,8	17,6	9,7	13,8
2	3	6,1	11,1	1,8	5,3	5,5
2	4	21,3	9,4	15,7	23,6	24,9
2	5	1,2	2,3	1,0	1,3	1,8
2	6	15,2	20,0	11,5	17,7	15,9
2	7	13,0	10,5	2,5	7,8	9,0
2	8	4,2	5,7	10,2	16,2	8,7
2	9	1,2	2,8	16,0	1,0	2,9
2	10	1,4	2,4	1,2	1,3	0,8
2	11	8,7	10,6	5,2	6,4	4,8
2	12	2,6	2,8	12,3	1,8	1,9
2	90	1,4	0,8	2,0	1,7	3,3
	SUMA	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabla 7. 2 Frecuencias haplotípicas en norteamericanos positivos para el HLA-A*24:Los haplotipos analizados se muestran subrayados en gris.

Haplotipo serológico		Frecuencia haplotípica [% de individuos positivos para HLA-A*24]				
HLA-A	**HLA-DR**	**Caucásico**	**Africano**	**Asiático**	**Latino-americano**	**Nativo americano**
24	1	8,2	7,9	5,4	4,1	4,6
24	2	15,7	18,8	24,6	10,7	14,8
24	3	6,0	7,5	1,4	3,7	4,0
24	4	14,9	14,4	19,8	25,8	21,6
24	5	2,0	1,6	1,4	2,7	1,0
24	6	17,0	18,7	9,6	20,5	20,7
24	7	9,2	7,9	2,5	4,8	4,3
24	8	4,0	3,8	5,7	12,4	11,3
24	9	1,4	1,7	9,9	0,7	5,8
24	10	1,6	1,2	0,8	2,0	0,6
24	11	16,5	8,0	5,2	9,0	5,4
24	12	1,8	7,5	11,5	2,2	2,4
24	90	1,6	1,0	2,2	1,3	3,3
	SUM	100,0	100,0	100,0	100.,0	100,0

Fundamento de la prueba

El ensayo de unión de MHC-péptido ProImmune REVEAL® determina la capacidad de cada péptido candidato para unirse al haplotipo HLA de clase II seleccionado y de estabilizar el complejo HLA-péptido. Así, los péptidos candidatos se ensamblan *in vitro* con una proteína HLA de clase II concreta. El grado de incorporación de cada péptido a las moléculas HLA se mide mediante la presencia o la ausencia de la conformación nativa del complejo HLA-péptido ensamblado en el momento 0 después de concluir el procedimiento de replegamiento (denominado en asociación, *on-rate*).

La capacidad de unión del péptido candidato a una molécula HLA concreta se compara con la de otro con propiedades de unión muy fuertes (control positivo) y ello da como resultado la puntuación de unión MHC-péptido de REVEAL®. El péptido de control positivo es seleccionado y suministrado por ProImmune a partir de su experiencia con cada haplotipo HLA.

Aparte de la afinidad del péptido por la molécula HLA concreta, el otro factor crucial para que se desencadene la respuesta inmunitaria es la estabilidad duradera del complejo HLA-péptido. En consecuencia, el complejo HLA-péptido formado se cuantificó después de permanecer en incubación 24 h a 37°C. La estabilidad del complejo MHC-péptido formado se calculó en forma de cociente porcentual de las puntuaciones de unión al cabo de 24 h y las puntuaciones de unión observadas justo después del replegamiento (esto es, en el momento 0).

Resultados

El análisis de POSTN-002 y de MMP12-002 en la prueba de unión MHC-péptido REVEAL® demostró que ambos péptidos se unen a varios haplotipos HLA. Quedó demostrado que POSTN-002 y MMP12-002 formaban complejos con 5 y con 4 de los 7

haplotipos HLA investigados, respectivamente (Figura 5). Ninguno de los dos péptidos se unió a HLA-DR3 ni a HLA-DR6. Las puntuaciones de unión detectadas se hallaban en el intervalo de entre el 0,02% y aproximadamente el 2,5% respecto al control positivo, puntuaciones claramente superiores a las de los péptidos que no se unían.

El análisis de la estabilidad de los complejos HLA-POSTN-002 y HLA-MMP12-002 formados reveló que 3 y 2 de los 7 complejos HLA-péptido investigados eran estables tras permanecer 24 h a 37°C, respectivamente (Figura 6).

La comparación de la puntuación de unión de este péptido con la de otro de inmunogenicidad conocida permite extraer conclusiones acerca de la inmunogenicidad de un péptido a tenor de su capacidad de unión a una molécula HLA. Así pues, para hacer una comparación de ese tipo se seleccionaron cinco péptidos investigados a fondo cuya inmunogenicidad se conocía. La inmunogenicidad de dichos péptidos se había determinado *ex vivo* en muestras de sangre de pacientes vacunados mediante linfocitos T CD4 sometidos a tinción intracelular de citocinas (ICS).

En principio, las pruebas ICS analizan la calidad de los linfocitos T específicos en lo relativo a sus funciones efectoras. Por lo tanto, se cultivaron *in vitro* células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y a continuación se reestimularon con el péptido de interés, un péptido de referencia y un control negativo (aquí designado *Mock*, «ficticio» en inglés). Después las células sometidas a reestimulación se tiñeron para detectar la producción de FN-gamma, TNF-alfa, IL-2 e IL-10, así como la expresión de la molécula coestimuladora CD154. El recuento de las células afectadas se hizo con un citómetro de flujo (Figura 7). **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Los análisis de la inmunogenicidad revelaron una respuesta inmunitaria del 100% tras la vacunación con los péptidos IMA950 (BIR-002 y MET-005) en 16 pacientes y del 44% al 86% tras la vacunación con los péptidos IMA910 (CEA-006, TGFBI-004 y MMP-001) en 71 pacientes.

A fin de comparar las puntuaciones de unión de POSTN-002 y de MMP12-002 con las de los péptidos IMA910 e IMA950, los péptidos se dispusieron en una tabla para cada haplotipo HLA-DR investigado de acuerdo con la puntuación de unión detectada (Tablas 8.1-8.5).

Tabla 8. 3 Comparación de las puntuaciones de unión a HLA-DR1 de POSTN-002 y de MMP12-002 con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II de inmunogenicidad conocida:POSTN-002 y MMP12-002 aparecen subrayados en gris.

Rango de péptido	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR1
1	BIR-002	IMA950	40,06
2	CEA-006	IMA910	1,31
3	MET-005	IMA950	0,87
4	POSTN-002	IMA-942	0,24
5	MMP-001	IMA901	0,19
6	MMP12-002	IMA-942	0,04
7	TGFBI-004	IMA910	0,03

Tabla 8.2 Comparación de las puntuaciones de unión a HLA-DR2 de POSTN-002 y de MMP12-002 con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II de inmunogenicidad conocida:POSTN-002 y MMP12-002 aparecen subrayados en gris.

Rango de péptido	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR1
1	MMP12-002	IMA-942	2,43
2	MMP-001	IMA901	0,7
3	POSTN-002	IMA-942	0,68
4	MET-005	IMA950	0,28
5	TGFBI-004	IMA910	0,28
6	BIR-002	IMA950	0,05
7	CEA-006	IMA910	0,03

Tabla 8. 3 Comparación de las puntuaciones de unión a HLA-DR4 de POSTN-002 y de MMP12-002 con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II de inmunogenicidad conocida:POSTN-002 y MMP12-002 aparecen subrayados en gris.

Rango de péptido	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR1
1	CEA-006	IMA910	39,65
2	BIR-002	IMA950	6,12
3	MET-005	IMA950	5,89
4	MMP12-002	IMA-942	0,74
5	MMP-001	IMA901	0,06
6	POSTN-002	IMA-942	0,02
7	TGFBI-004	IMA910	0,02

Tabla 8. 4 Comparación de las puntuaciones de unión a HLA-DR5 de POSTN-002 y de MMP12-002 con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II de inmunogenicidad conocida:POSTN-002 y MMP12-002 aparecen subrayados en gris.

Rango de péptido	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR1
1	BIR-002	IMA950	103,9
2	MMP-001	IMA901	47,82
3	CEA-006	IMA910	24,27
4	MET-005	IMA950	0,12
5	POSTN-002	IMA-942	0,08
6	MMP12-002	IMA-942	0,04
7	TGFBI-004	IMA910	0,04

Tabla 8. 5 Comparación de las puntuaciones de unión a HLA-DR7 de POSTN-002 y de MMP12-002 con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II de inmunogenicidad conocida:POSTN-002 y MMP12-002 aparecen subrayados en gris.

Rango de péptido	Código del péptido	Origen	Puntuación de

			unión relativa HLA-DR1
1	MET-005	IMA950	3,69
2	CEA-006	IMA910	0,63
3	POSTN-002	IMA-942	0,47
4	BIR-002	IMA950	0,27
5	TGFBI-004	IMA910	0,01
6	MMP-001	IMA901	0
7	MMP12-002	IMA-942	0

La comparación de las puntuaciones de unión de POSTN-002 y de MMP12-002 con las puntuaciones de unión de otros péptidos de clase II cuya inmunogenicidad era conocida demostró que la capacidad de unión de ambos péptidos está localizada principalmente en la mitad inferior de las tablas con la excepción de HLA-DR2. La capacidad de unión de ambos péptidos a HLA-DR2 está localizada en la mitad superior de la tabla, con MMP12-002 como el primer candidato. A tenor de este análisis cabe esperar que ambos péptidos, POSTN-002 y MMP12-002, desencadenen también una respuesta inmunitaria.

Referencias bibliográficas

Acuff HB, Sinnamon M, Fingleton B, Boone B, Levy SE, Chen X, Pozzi A, Carbone DP, Schwartz DR, Moin K, Sloane BF, Matrisian LM (2006). Analysis of host- and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer. Cancer Res *66*, 7968-7975.

Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. Cell *123*, 409-421.

Albig AR, Schiemann WP (2005). Identification and characterization of regulator of G protein signaling 4 (RGS4) as a novel inhibitor of tubulogenesis: RGS4 inhibits mitogen-activated protein kinases and vascular endothelial growth factor signaling. Mol. Biol. Cell *16*, 609-625.

Allison JP, Krummel MF (1995). The Yin and Yang of T cell costimulation. Science *270*, 932-933.

An CH, Kim YR, Kim HS, Kim SS, Yoo NJ, Lee SH (2012). Frameshift mutations of vacuolar protein sorting genes in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. Hum. Pathol. *43*, 40-47.

Appay V, Speiser DE, Rufer N, Reynard S, Barbey C, Cerottini JC, Leyvraz S, Pinilla C, Romero P (2006). Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. Eur. J Immunol. *36*, 1805-1814.

Araki W, Takahashi-Sasaki N, Chui DH, Saito S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Murayama KS, Kametani F, Shiraishi H, Komano H, Tabira T (2008). A family of membrane proteins associated with presenilin expression and gamma-secretase function. FASEB J *22*, 819-827.

Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Hesselgesser J, Horuk R, Strieter RM (1997). The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. J Leukoc. Biol. *62*, 554-562.

Asteriti IA, Rensen WM, Lindon C, Lavia P, Guarguaglini G (2010). The Aurora-A/TPX2 complex: a novel oncogenic holoenzyme? Biochim. Biophys. Acta *1806*, 230-239.
Aylsworth A, Jiang SX, Desbois A, Hou ST (2009). Characterization of the role of full-length CRMP3 and its calpain-cleaved product in inhibiting microtubule polymerization and neurite outgrowth. Exp. Cell Res. *315*, 2856-2868.
Badiglian FL, Oshima CT, De Oliveira LF, De Oliveira CH, De Sousa DR, Gomes TS, Goncalves WJ (2009). Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. Oncol Rep. *21*, 313-320.
Bargo S, Raafat A, McCurdy D, Amirjazil I, Shu Y, Traicoff J, Plant J, Vonderhaar BK, Callahan R (2010). Transforming acidic coiled-coil protein-3 (Tacc3) acts as a negative regulator of Notch signaling through binding to CDC10/Ankyrin repeats. Biochem. Biophys. Res Commun. *400*, 606-612.
Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K, Verhoeven G, Swinnen JV (2007). Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. Cancer Res. *67*, 8180-8187.
Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. Science *248*, 850-854.
Behrens P, Brinkmann U, Fogt F, Wernert N, Wellmann A (2001). Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. Anticancer Res. *21*, 2413-2417.
Belaaouaj A, Kim KS, Shapiro SD (2000). Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase. Science *289*, 1185-1188.
Beljan PR, Durdov MG, Capkun V, Ivcevic V, Pavlovic A, Soljic V, Peric M (2012). IMP3 can predict aggressive behaviour of lung adenocarcinoma. Diagn. Pathol. *7*, 165.
Benaglio P, McGee TL, Capelli LP, Harper S, Berson EL, Rivolta C (2011). Next generation sequencing of pooled samples reveals new SNRNP200 mutations associated with retinitis pigmentosa. Hum. Mutat. *32*, E2246-E2258.
Bennett G, Sadlier D, Doran PP, Macmathuna P, Murray DW (2011). A functional and transcriptomic analysis of NET1 bioactivity in gastric cancer. BMC. Cancer *11*, 50.
Bergner A, Kellner J, Tufman A, Huber RM (2009). Endoplasmic reticulum Ca2+-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. J Exp. Clin Cancer Res. *28*, 25.
Bird AW, Hyman AA (2008). Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. J Cell Biol. *182*, 289-300.
Boni R, Wellmann A, Man YG, Hofbauer G, Brinkmann U (1999). Expression of the proliferation and apoptosis-associated CAS protein in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. Am. J Dermatopathol. *21*, 125-128.
Brandt S, Ellwanger K, Beuter-Gunia C, Schuster M, Hausser A, Schmitz I, Beer-Hammer S (2010). SLy2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex. Int. J Biochem. Cell Biol. *42*, 1472-1481.
Brozic P, Turk S, Rizner TL, Gobec S (2011). Inhibitors of aldo-keto reductases AKR1C1-AKR1C4. Curr. Med. Chem. *18*, 2554-2565.
Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F (2004). From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. Curr. Pharm. Biotechnol. *5*, 29-43.
Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Moller M, Eriksen JA, Gaudernack G (2006). Telomerase

peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Immunol. Immunother. *55*, 1553-1564.
Brusselmans K, De SE, Verhoeven G, Swinnen JV (2005). RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. Cancer Res. *65*, 6719-6725.
Brustmann H (2004). Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. Gynecol. Oncol *92*, 268-276.
Bukau B, Horwich AL (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell *92*, 351-366.
Byrns MC, Jin Y, Penning TM (2011). Inhibitors of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): overview and structural insights. J Steroid Biochem. Mol. Biol. *125*, 95-104.
Calabrese F, Lunardi F, Balestro E, Marulli G, Perissinotto E, Loy M, Nannini N, Valente M, Saetta M, Agostini C, Rea F (2012). Serpin B4 isoform overexpression is associated with aberrant epithelial proliferation and lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. Pathology *44*, 192-198.
Cao X, Coskun U, Rossle M, Buschhorn SB, Grzybek M, Dafforn TR, Lenoir M, Overduin M, Simons K (2009). Golgi protein FAPP2 tubulates membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *106*, 21121-21125.
Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, Louis R, Noel A, Foidart JM (2003). Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand) *49*, 875-884.
Chajes V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. Cancer Res. *66*, 5287-5294.
Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Mol. Cell Biochem. *253*, 269-285.
Chami M, Gozuacik D, Saigo K, Capiod T, Falson P, Lecoeur H, Urashima T, Beckmann J, Gougeon ML, Claret M, le MM, Brechot C, Paterlini-Brechot P (2000). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis. Oncogene *19*, 2877-2886.
Chandler S, Cossins J, Lury J, Wells G (1996). Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein. Biochem. Biophys. Res Commun. *228*, 421-429.
Chang CC, Tai CJ, Su TC, Shen KH, Lin SH, Yeh CM, Yeh KT, Lin YM, Jiang MC (2012). The prognostic significance of nuclear CSE1L in urinary bladder urothelial carcinomas. Ann. Diagn. Pathol. *16*, 362-368.
Chanock SJ, Foster CB, Miller FW, O'Hanlon TP (2004). HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA. Hum. Immunol. *65*, 1211-1223.
Chen CY, Fang HY, Chiou SH, Yi SE, Huang CY, Chiang SF, Chang HW, Lin TY, Chiang IP, Chow KC (2011a). Sumoylation of eukaryotic elongation factor 2 is vital for protein stability and anti-apoptotic activity in lung adenocarcinoma cells. Cancer Sci. *102*, 1582-1589.
Chen CY, Fang HY, Chiou SH, Yi SE, Huang CY, Chiang SF, Chang HW, Lin TY, Chiang IP, Chow KC (2011b). Sumoylation of eukaryotic elongation factor 2 is vital for protein stability and anti-apoptotic activity in lung adenocarcinoma cells. Cancer Sci. *102*, 1582-1589.

Chen D, Brooks CL, Gu W (2006). ARF-BP1 as a potential therapeutic target. Br. J Cancer *94*, 1555-1558.
Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W (2005a). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. Cell *121*, 1071-1083.
Chen DR, Chien SY, Kuo SJ, Teng YH, Tsai HT, Kuo JH, Chung JG (2010a). SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. Anticancer Res. *30*, 4135-4140.
Chen J, Emara N, Solomides C, Parekh H, Simpkins H (2010b). Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines. Cancer Chemother. Pharmacol. *66*, 1103-1111.
Chen JF, Zhang LJ, Zhao AL, Wang Y, Wu N, Xiong HC, Liang Z, Li JY, Huang XF, Yang Y (2005b). [Abnormal expression of Thy-1 as a novel tumor marker in lung cancer and its prognostic significance]. Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi. *85*, 1921-1925.
Chen P, Wang SJ, Wang HB, Ren P, Wang XQ, Liu WG, Gu WL, Li DQ, Zhang TG, Zhou CJ (2012). The distribution of IGF2 and IMP3 in osteosarcoma and its relationship with angiogenesis. J Mol. Histol. *43*, 63-70.
Cho NH, Hong KP, Hong SH, Kang S, Chung KY, Cho SH (2004). MMP expression profiling in recurred stage IB lung cancer. Oncogene *23*, 845-851.
Choi KU, Yun JS, Lee IH, Heo SC, Shin SH, Jeon ES, Choi YJ, Suh DS, Yoon MS, Kim JH (2010). Lysophosphatidic acid-induced expression of periostin in stromal cells: Prognoistic relevance of periostin expression in epithelial ovarian cancer. Int J Cancer.
Chong IW, Chang MY, Chang HC, Yu YP, Sheu CC, Tsai JR, Hung JY, Chou SH, Tsai MS, Hwang JJ, Lin SR (2006). Great potential of a panel of multiple hMTH1, SPD, ITGA11 and COL11A1 markers for diagnosis of patients with non-small cell lung cancer. Oncol Rep. *16*, 981-988.
Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S (1997). Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. Cancer *80*, 1489-1496.
Chung FY, Cheng TL, Chang HJ, Chiu HH, Huang MY, Chang MS, Chen CC, Yang MJ, Wang JY, Lin SR (2010). Differential gene expression profile of MAGE family in taiwanese patients with colorectal cancer. J Surg. Oncol *102*, 148-153.
Ciocca DR, Calderwood SK (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress. Chaperones. *10*, 86-103.
Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL (1992). Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. Cancer Res. *52*, 3648-3654.
Claudio JO, Zhu YX, Benn SJ, Shukla AH, McGlade CJ, Falcioni N, Stewart AK (2001). HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. Oncogene *20*, 5373-5377.
Coe BP, Henderson LJ, Garnis C, Tsao MS, Gazdar AF, Minna J, Lam S, MacAulay C, Lam WL (2005). High-resolution chromosome arm 5p array CGH analysis of small cell lung carcinoma cell lines. Genes Chromosomes. Cancer *42*, 308-313.
Colombetti S, Basso V, Mueller DL, Mondino A (2006). Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. J Immunol. *176*, 2730-2738.
Confalonieri S, Quarto M, Goisis G, Nuciforo P, Donzelli M, Jodice G, Pelosi G, Viale G, Pece S, Di Fiore PP (2009). Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor. Oncogene *28*, 2959-2968.
Cooper CR, Graves B, Pruitt F, Chaib H, Lynch JE, Cox AK, Sequeria L, van Golen KL, Evans A, Czymmek K, Bullard RS, Donald CD, Sol-Church K, Gendernalik JD,

Weksler B, Farach-Carson MC, Macoska JA, Sikes RA, Pienta KJ (2008). Novel surface expression of reticulocalbin 1 on bone endothelial cells and human prostate cancer cells is regulated by TNF-alpha. J Cell Biochem. *104*, 2298-2309.
Cooper WA, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, Kennedy C, Sutherland RL, Lee CS (2009). Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. Histopathology *55*, 28-36.
Cordes C, Munzel AK, Gorogh T, Leuschner I, Ambrosch P, Gottschlich S, Hoffmann M (2010). Prognostic relevance of the proliferation marker REPP86 for laryngeal cancer. Anticancer Res *30*, 3541-3547.
Creighton CJ, Bromberg-White JL, Misek DE, Monsma DJ, Brichory F, Kuick R, Giordano TJ, Gao W, Omenn GS, Webb CP, Hanash SM (2005). Analysis of tumor-host interactions by gene expression profiling of lung adenocarcinoma xenografts identifies genes involved in tumor formation. Mol. Cancer Res *3*, 119-129.
D'Angelo G, Rega LR, De Matteis MA (2012). Connecting vesicular transport with lipid synthesis: FAPP2. Biochim. Biophys. Acta *1821*, 1089-1095.
Da Forno PD, Pringle JH, Hutchinson P, Osborn J, Huang Q, Potter L, Hancox RA, Fletcher A, Saldanha GS (2008). WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. Clin Cancer Res *14*, 5825-5832.
de Souza Meyer EL, Dora JM, Wagner MS, Maia AL (2005). Decreased type 1 iodothyronine deiodinase expression might be an early and discrete event in thyroid cell dedifferentation towards papillary carcinoma. Clin Endocrinol. (Oxf) *62*, 672-678.
Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A (1997). Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. J Intern. Med *242*, 41-48.
Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic S (2006). Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas. Clin Cancer Res. *12*, 4163-4170.
Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature *432*, 231-235.
Denys H, De WO, Nusgens B, Kong Y, Sciot R, Le AT, Van DK, Jadidizadeh A, Tejpar S, Mareel M, Alman B, Cassiman JJ (2004). Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours. Br. J Cancer *90*, 1443-1449.
Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. Oncogene *24*, 2909-2915.
Dharmavaram RM, Huynh AI, Jimenez SA (1998). Characterization of human chondrocyte and fibroblast type XII collagen cDNAs. Matrix Biol. *16*, 343-348.
Dobashi Y, Shoji M, Jiang SX, Kobayashi M, Kawakubo Y, Kameya T (1998). Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. Am J Pathol. *153*, 963-972.
Dolznig H, Schweifer N, Puri C, Kraut N, Rettig WJ, Kerjaschki D, Garin-Chesa P (2005). Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. Cancer Immun. *5*, 10.
Dong-Dong L (2007). Small interfering RNA (siRNA) inhibited human liver cancer cell line SMMC7721 proliferation and tumorigenesis. Hepatogastroenterology *54*, 1731-1735.
Drucker KL, Kitange GJ, Kollmeyer TM, Law ME, Passe S, Rynearson AL, Blair H, Soderberg CL, Morlan BW, Ballman KV, Giannini C, Jenkins RB (2009).

Characterization and gene expression profiling in glioma cell lines with deletion of chromosome 19 before and after microcell-mediated restoration of normal human chromosome 19. Genes Chromosomes. Cancer *48*, 854-864.
Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science *298*, 850-854.
Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. *23*, 2346-2357.
Ecimovic P, Murray D, Doran P, McDonald J, Lambert DG, Buggy DJ (2011). Direct effect of morphine on breast cancer cell function *in vitro*: role of the NET1 gene. Br. J Anaesth. *107*, 916-923.
Ehrmann J, Strakova N, Vrzalikova K, Hezova R, Kolar Z (2008). Expression of STATs and their inhibitors SOCS and PIAS in brain tumors. *In vitro* and *in vivo* study. Neoplasma *55*, 482-487.
Fang WY, Liu TF, Xie WB, Yang XY, Wang S, Ren CP, Deng X, Liu QZ, Huang ZX, Li X, Ding YQ, Yao KT (2005). Reexploring the possible roles of some genes associated with nasopharyngeal carcinoma using microarray-based detection. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai) *37*, 541-546.
Feng CJ, Li HJ, Li JN, Lu YJ, Liao GQ (2008). Expression of Mcm7 and Cdc6 in oral squamous cell carcinoma and precancerous lesions. Anticancer Res *28*, 3763-3769.
Findeis-Hosey JJ, Xu H (2012). Insulin-like growth factor II-messenger RNA-binding protein-3 and lung cancer. Biotech. Histochem. *87*, 24-29.
Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO, Wang HL, Xu H (2010). IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. Hum. Pathol. *41*, 477-484.
Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *98*, 8809-8814.
Fukuda T, Oyamada H, Isshiki T, Maeda M, Kusakabe T, Hozumi A, Yamaguchi T, Igarashi T, Hasegawa H, Seidoh T, Suzuki T (2007). Distribution and variable expression of secretory pathway protein reticulocalbin in normal human organs and non-neoplastic pathological conditions. J Histochem. Cytochem. *55*, 335-345.
Gamero AM, Young MR, Mentor-Marcel R, Bobe G, Scarzello AJ, Wise J, Colburn NH (2010). STAT2 contributes to promotion of colorectal and skin carcinogenesis. Cancer Prev. Res. (Phila) *3*, 495-504.
Gares SL, Pilarski LM (2000). Balancing thymocyte adhesion and motility: a functional linkage between beta1 integrins and the motility receptor RHAMM. Dev. Immunol *7*, 209-225.
Garg M, Kanojia D, Saini S, Suri S, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010a). Germ cell-specific heat shock protein 70-2 is expressed in cervical carcinoma and is involved in the growth, migration, and invasion of cervical cells. Cancer *116*, 3785-3796.
Garg M, Kanojia D, Seth A, Kumar R, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010b). Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion. Eur. J Cancer *46*, 207-215.

Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. Nat. Rev. Immunol. *6*, 383-393.
Ghosh S, Albitar L, LeBaron R, Welch WR, Samimi G, Birrer MJ, Berkowitz RS, Mok SC (2010). Up-regulation of stromal versican expression in advanced stage serous ovarian cancer. Gynecol. Oncol *119*, 114-120.
Gorrin Rivas MJ, Arii S, Furutani M, Harada T, Mizumoto M, Nishiyama H, Fujita J, Imamura M (1998). Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: correlation with angiostatin generation and its clinical significance. Hepatology *28*, 986-993.
Gorrin-Rivas MJ, Arii S, Mori A, Takeda Y, Mizumoto M, Furutani M, Imamura M (2000). Implications of human macrophage metalloelastase and vascular endothelial growth factor gene expression in angiogenesis of hepatocellular carcinoma. Ann Surg *231*, 67-73.
Graf F, Mosch B, Koehler L, Bergmann R, Wuest F, Pietzsch J (2010). Cyclin-dependent kinase 4/6 (cdk4/6) inhibitors: perspectives in cancer therapy and imaging. Mini. Rev. Med. Chem. *10*, 527-539.
Greenfield JJ, High S (1999). The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. J Cell Sci. *112 (Pt 10)*, 1477-1486.
Gregory KE, Keene DR, Tufa SF, Lunstrum GP, Morris NP (2001). Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. J Bone Miner. Res. *16*, 2005-2016.
Grunda JM, Fiveash J, Palmer CA, Cantor A, Fathallah-Shaykh HM, Nabors LB, Johnson MR (2010). Rationally designed pharmacogenomic treatment using concurrent capecitabine and radiotherapy for glioblastoma; gene expression profiles associated with outcome. Clin Cancer Res. *16*, 2890-2898.
Gruter P, Tabernero C, von KC, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber BK, Izaurralde E (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. Mol. Cell *1*, 649-659.
Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Blondal T, Gylfason A, Agnarsson BA, Benediktsdottir KR, Magnusdottir DN, Orlygsdottir G, Jakobsdottir M, Stacey SN, Sigurdsson A, Wahlfors T, Tammela T, Breyer JP, McReynolds KM, Bradley KM, Saez B, Godino J, Navarrete S, Fuertes F, Murillo L, Polo E, Aben KK, van Oort IM, Suarez BK, Helfand BT, Kan D, Zanon C, Frigge ML, Kristjansson K, Gulcher JR, Einarsson GV, Jonsson E, Catalona WJ, Mayordomo JI, Kiemeney LA, Smith JR, Schleutker J, Barkardottir RB, Kong A, Thorsteinsdottir U, Rafnar T, Stefansson K (2009). Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. Nat Genet. *41*, 1122-1126.
Guo Y, Hsu DK, Feng SL, Richards CM, Winkles JA (2001). Polypeptide growth factors and phorbol ester induce progressive ankylosis (ank) gene expression in murine and human fibroblasts. J Cell Biochem. *84*, 27-38.
Hagemann T, Gunawan B, Schulz M, Fuzesi L, Binder C (2001). mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. Eur. J Cancer *37*, 1839-1846.
Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y (2006). Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. Cancer Sci. *97*, 113-118.
Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell *125*, 887-901.

Han S, Nam J, Li Y, Kim S, Cho SH, Cho YS, Choi SY, Choi J, Han K, Kim Y, Na M, Kim H, Bae YC, Choi SY, Kim E (2010). Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. J Neurosci. *30*, 15102-15112.
Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science *295*, 1852-1858.
Hase ME, Yalamanchili P, Visa N (2006). The Drosophila heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M protein, HRP59, regulates alternative splicing and controls the production of its own mRNA. J Biol. Chem. *281*, 39135-39141.
Hernandez I, Moreno JL, Zandueta C, Montuenga L, Lecanda F (2010). Novel alternatively spliced ADAM8 isoforms contribute to the aggressive bone metastatic phenotype of lung cancer. Oncogene *29*, 3758-3769.
Hitakomate E, Hood FE, Sanderson HS, Clarke PR (2010). The methylated N-terminal tail of RCC1 is required for stabilisation of its interaction with chromatin by Ran in live cells. BMC. Cell Biol. *11*, 43.
Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, Herrero E, Balcells S, Gonzalez-Duarte R (2002). ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. Genome Biol. *3*, RESEARCH0027.
Ho CY, Wong CH, Li HY (2008). Perturbation of the chromosomal binding of RCC1, Mad2 and survivin causes spindle assembly defects and mitotic catastrophe. J Cell Biochem. *105*, 835-846.
Hochrainer K, Mayer H, Baranyi U, Binder B, Lipp J, Kroismayr R (2005). The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects. Genomics *85*, 153-164.
Hofmann HS, Hansen G, Richter G, Taege C, Simm A, Silber RE, Burdach S (2005). Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res *11*, 1086-1092.
Honda A, Valogne Y, Bou NM, Brechot C, Faivre J (2012). An intron-retaining splice variant of human cyclin A2, expressed in adult differentiated tissues, induces a G1/S cell cycle arrest *in vitro*. PLoS. ONE. *7*, e39249.
Honore B, Baandrup U, Vorum H (2004). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. Exp. Cell Res. *294*, 199-209.
Hood FE, Royle SJ (2011). Pulling it together: The mitotic function of TACC3. Bioarchitecture. *1*, 105-109.
Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. Autophagy. *5*, 973-979.
Houghton AM, Grisolano JL, Baumann ML, Kobayashi DK, Hautamaki RD, Nehring LC, Cornelius LA, Shapiro SD (2006). Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases. Cancer Res *66*, 6149-6155.
Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK, Shapiro SD (2010). Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. Nat Med. *16*, 219-223.
Hovhannisyan RH, Carstens RP (2007). Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. J Biol. Chem. *282*, 36265-36274.
Hua D, Shen L, Xu L, Jiang Z, Zhou Y, Yue A, Zou S, Cheng Z, Wu S (2012). Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 regulates cellular metastasis-associated behavior in gastric cancer. Int. J Mol. Med. *30*, 1267-1274.

Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M (2005). Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol *23*, 8765-8773.
Huang KH, Chiou SH, Chow KC, Lin TY, Chang HW, Chiang IP, Lee MC (2010). Overexpression of aldo-keto reductase 1C2 is associated with disease progression in patients with prostatic cancer. Histopathology *57*, 384-394.
Huang MY, Wang HM, Tok TS, Chang HJ, Chang MS, Cheng TL, Wang JY, Lin SR (2012). EVI2B, ATP2A2, S100B, TM4SF3, and OLFM4 as potential prognostic markers for postoperative Taiwanese colorectal cancer patients. DNA Cell Biol. *31*, 625-635.
Huo J, Liu Y, Ma J, Xiao S (2010). A novel splice-site mutation of ATP2A2 gene in a Chinese family with Darier disease. Arch. Dermatol. Res. *302*, 769-772.
Hwang YS, Park KK, Cha IH, Kim J, Chung WY (2012). Role of insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein-3 in invadopodia formation and the growth of oral squamous cell carcinoma in athymic nude mice. Head Neck *34*, 1329-1339.
Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y (2004). ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. Clin Cancer Res. *10*, 8363-8370.
Ishikawa Y, Vranka J, Wirz J, Nagata K, Bachinger HP (2008). The rough endoplasmic reticulum-resident FK506-binding protein FKBP65 is a molecular chaperone that interacts with collagens. J Biol. Chem. *283*, 31584-31590.
Ito K, Takahashi A, Morita M, Suzuki T, Yamamoto T (2011). The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA deadenylation and cell viability. Protein Cell *2*, 755-763.
Iuchi S, Green H (1999). Basonuclin, a zinc finger protein of keratinocytes and reproductive germ cells, binds to the rRNA gene promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *96*, 9628-9632.
Jalbout M, Bouaouina N, Gargouri J, Corbex M, Ben AS, Chouchane L (2003). Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett. *193*, 75-81.
Jeng YM, Wang TH, Lu SH, Yuan RH, Hsu HC (2009). Prognostic significance of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression in gastric adenocarcinoma. Br. J Surg *96*, 66-73.
Jung CK, Jung JH, Park GS, Lee A, Kang CS, Lee KY (2006). Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel independent prognostic marker in non-small cell lung cancer. Pathol. Int *56*, 503-509.
Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 4611-4615.
Kabbarah O, Nogueira C, Feng B, Nazarian RM, Bosenberg M, Wu M, Scott KL, Kwong LN, Xiao Y, Cordon-Cardo C, Granter SR, Ramaswamy S, Golub T, Duncan LM, Wagner SN, Brennan C, Chin L (2010). Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. PLoS. ONE. *5*, e10770.
Kadara H, Lacroix L, Behrens C, Solis L, Gu X, Lee JJ, Tahara E, Lotan D, Hong WK, Wistuba II, Lotan R (2009). Identification of gene signatures and molecular markers for human lung cancer prognosis using an *in vitro* lung carcinogenesis system. Cancer Prev. Res (Phila) *2*, 702-711.
Kamlekar RK, Simanshu DK, Gao YG, Kenoth R, Pike HM, Prendergast FG, Malinina L, Molotkovsky JG, Venyaminov SY, Patel DJ, Brown RE (2013). The glycolipid

transfer protein (GLTP) domain of phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein-2 (FAPP2): structure drives preference for simple neutral glycosphingolipids. Biochim. Biophys. Acta *1831*, 417-427.
Kanno A, Satoh K, Masamune A, Hirota M, Kimura K, Umino J, Hamada S, Satoh A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T (2008). Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. Int J Cancer *122*, 2707-2718.
Kanno T, Kamba T, Yamasaki T, Shibasaki N, Saito R, Terada N, Toda Y, Mikami Y, Inoue T, Kanematsu A, Nishiyama H, Ogawa O, Nakamura E (2012). JunB promotes cell invasion and angiogenesis in VHL-defective renal cell carcinoma. Oncogene *31*, 3098-3110.
Kao RH, Francia G, Poulsom R, Hanby AM, Hart IR (2003). Application of differential display, with in situ hybridization verification, to microscopic samples of breast cancer tissue. Int. J Exp. Pathol. *84*, 207-212.
Kars MD, Iseri OD, Gunduz U (2011). A microarray based expression profiling of paclitaxel and vincristine resistant MCF-7 cells. Eur. J Pharmacol. *657*, 4-9.
Katagiri C, Iida T, Nakanishi J, Ozawa M, Aiba S, Hibino T (2010). Up-regulation of serpin SCCA1 is associated with epidermal barrier disruption. J Dermatol. Sci. *57*, 95-101.
Katoh M (2008). WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. Curr. Drug Targets. *9*, 565-570.
Katoh M, Katoh M (2007). STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review). Int J Mol. Med *19*, 273-278.
Kawata H, Shimada N, Kamiakito T, Komatsu K, Morita T, Ota T, Obayashi M, Shitara K, Tanaka A (2012). RhoC and guanine nucleotide exchange factor Net1 in androgen-unresponsive mouse mammary carcinoma SC-4 cells and human prostate cancer after short-term endocrine therapy. Prostate *72*, 1071-1079.
Kelly SM, Corbett AH (2009). Messenger RNA export from the nucleus: a series of molecular wardrobe changes. Traffic. *10*, 1199-1208.
Kennedy A, Dong H, Chen D, Chen WT (2009). Elevation of seprase expression and promotion of an invasive phenotype by collagenous matrices in ovarian tumor cells. Int J Cancer *124*, 27-35.
Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. Acta Physiol (Oxf) *204*, 17-33.
Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T, Shimazu K, Morishita Y, Shimazaki M, Kii I, Horie H, Nagai H, Kudo A, Fukayama M (2008). Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. J Histochem. Cytochem. *56*, 753-764.
Kim DH, Park SE, Kim M, Ji YI, Kang MY, Jung EH, Ko E, Kim Y, Kim S, Shim YM, Park J (2011). A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers. Cancer *117*, 4080-4091.
Kim EH, Park AK, Dong SM, Ahn JH, Park WY (2010a). Global analysis of CpG methylation reveals epigenetic control of the radiosensitivity in lung cancer cell lines. Oncogene *29*, 4725-4731.
Kim HS, Kim dH, Kim JY, Jeoung NH, Lee IK, Bong JG, Jung ED (2010b). Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. Korean J Intern. Med. *25*, 399-407.

Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massague J (2009). Tumor self-seeding by circulating cancer cells. Cell *139*, 1315-1326.
Kim S, Park HS, Son HJ, Moon WS (2004). [The role of angiostatin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and 12 in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma]. Korean J Hepatol. *10*, 62-72.
Kimura J, Kudoh T, Miki Y, Yoshida K (2011). Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. Int. J Cancer *128*, 1524-1531.
Kloth JN, Oosting J, van WT, Szuhai K, Knijnenburg J, Gorter A, Kenter GG, Fleuren GJ, Jordanova ES (2007). Combined array-comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex genetic alterations in cervical cancer. BMC. Genomics *8*, 53.
Knight HM, Pickard BS, Maclean A, Malloy MP, Soares DC, McRae AF, Condie A, White A, Hawkins W, McGhee K, van BM, MacIntyre DJ, Starr JM, Deary IJ, Visscher PM, Porteous DJ, Cannon RE, St CD, Muir WJ, Blackwood DH (2009). A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. Am J Hum. Genet. *85*, 833-846.
Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Traskelin AL, Perveen R, Kivitie-Kallio S, Norio R, Warburg M, Fryns JP, de la Chapelle A, Lehesjoki AE (2003). Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. Am. J Hum. Genet. *72*, 1359-1369.
Konishi N, Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Ota I, Tanaka N, Fujimoto K (2008). Function of JunB in transient amplifying cell senescence and progression of human prostate cancer. Clin Cancer Res. *14*, 4408-4416.
Kornak U, Brancati F, Le MM, Lichtenbelt K, Hohne W, Tinschert S, Garaci FG, Dallapiccola B, Nurnberg P (2010). Three novel mutations in the ANK membrane protein cause craniometaphyseal dysplasia with variable conductive hearing loss. Am. J Med. Genet. A *152A*, 870-874.
Korosec B, Glavac D, Rott T, Ravnik-Glavac M (2006). Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. Cancer Genet. Cytogenet. *171*, 105-111.
Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, Merseburger AS, Soloway M, Lokeshwar VB (2010). Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. Cancer.
Krieg AM (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. Nat. Rev. Drug Discov. *5*, 471-484.
Kuang P, Zhou C, Li X, Ren S, Li B, Wang Y, Li J, Tang L, Zhang J, Zhao Y (2012). Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase 2 as a potential biomarker for predicting cisplatin efficacy in advanced NSCLC patients. Lung Cancer *77*, 427-432.
Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, Wei Y, Jelinek J, Issa JP, Garcia-Manero G (2008). Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. Leukemia *22*, 1529-1538.
Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, Kitagawa M, Kawai H, Gaffney PM, Miyauchi M, Takata T (2006). Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. Cancer Res *66*, 6928-6935.
Kwon OH, Park JL, Kim M, Kim JH, Lee HC, Kim HJ, Noh SM, Song KS, Yoo HS, Paik SG, Kim SY, Kim YS (2011). Aberrant up-regulation of LAMB3 and LAMC2 by

promoter demethylation in gastric cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. *406*, 539-545.
Kwon YJ, Lee SJ, Koh JS, Kim SH, Kim YJ, Park JH (2009). Expression patterns of aurora kinase B, heat shock protein 47, and periostin in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Res *18*, 141-151.
Labied S, Galant C, Nisolle M, Ravet S, Munaut C, Marbaix E, Foidart JM, Frankenne F (2009). Differential elevation of matrix metalloproteinase expression in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time. Hum. Reprod. *24*, 113-121.
Lau E, Zhu C, Abraham RT, Jiang W (2006). The functional role of Cdc6 in S-G2/M in mammalian cells. EMBO Rep. *7*, 425-430.
Lazaris AC, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, Golematis BC (1997). Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. Breast Cancer Res. Treat. *43*, 43-51.
Le CB, Rynkowski M, Le MM, Bruyere C, Lonez C, Gras T, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Ruysschaert JM, Kiss R, Lefranc F (2010). Long-term *in vitro* treatment of human glioblastoma cells with temozolomide increases resistance *in vivo* through up-regulation of GLUT transporter and aldo-keto reductase enzyme AKR1C expression. Neoplasia. *12*, 727-739.
Lee KH, Kim JR (2012). Regulation of HGF-mediated cell proliferation and invasion through NF-kappaB, JunB, and MMP-9 cascades in stomach cancer cells. Clin Exp. Metastasis *29*, 263-272.
Lee WS, Jain MK, Arkonac BM, Zhang D, Shaw SY, Kashiki S, Maemura K, Lee SL, Hollenberg NK, Lee ME, Haber E (1998). Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. Circ. Res *82*, 845-851.
Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature *425*, 415-419.
Lefave CV, Squatrito M, Vorlova S, Rocco GL, Brennan CW, Holland EC, Pan YX, Cartegni L (2011). Splicing factor hnRNPH drives an oncogenic splicing switch in gliomas. EMBO J *30*, 4084-4097.
Leivo I, Jee KJ, Heikinheimo K, Laine M, Ollila J, Nagy B, Knuutila S (2005). Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation. Cancer Genet. Cytogenet. *156*, 104-113.
Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD, Rammensee HG, Stevanovic S (2004). Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. Nat. Biotechnol. *22*, 450-454.
Li H, Guo L, Li J, Liu N, Liu J (2000a). Alternative splicing of RHAMM gene in chinese gastric cancers and its *in vitro* regulation. Zhonghua Yi. Xue. Yi. Chuan Xue. Za Zhi. *17*, 343-347.
Li H, Guo L, Li JW, Liu N, Qi R, Liu J (2000b). Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumor progression. Int J Oncol *17*, 927-932.
Li HG, Han JJ, Huang ZQ, Wang L, Chen WL, Shen XM (2011). IMP3 is a novel biomarker to predict metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma. J Craniofac. Surg. *22*, 2022-2025.
Li J, Ying J, Fan Y, Wu L, Ying Y, Chan AT, Srivastava G, Tao Q (2010). WNT5A antagonizes WNT/beta-catenin signaling and is frequently silenced by promoter CpG methylation in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Biol. Ther. *10*, 617-624.

Li Y, Chu LW, LI Z, Yik PY, Song YQ (2009). A study on the association of the chromosome 12p13 locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease in Chinese. Dement. Geriatr. Cogn Disord. *27*, 508-512.
Liang WJ, Qiu F, Hong MH, Guo L, Qin HD, Liu QC, Zhang XS, Mai HQ, Xiang YQ, Min HQ, Zeng YX (2008). [Differentially expressed genes between upward and downward progressing types of nasopharyngeal carcinoma]. Ai. Zheng. *27*, 460-465.
Liao B, Hu Y, Brewer G (2011). RNA-binding protein insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP-3) promotes cell survival via insulin-like growth factor II signaling after ionizing radiation. J Biol. Chem. *286*, 31145-31152.
Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G (2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. J Biol. Chem. *280*, 18517-18524.
Lin DM, Ma Y, Xiao T, Guo SP, Han NJ, Su K, Yi SZ, Fang J, Cheng SJ, Gao YN (2006). [TPX2 expression and its significance in squamous cell carcinoma of lung]. Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi. *35*, 540-544.
Litjens SH, de Pereda JM, Sonnenberg A (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. Trends Cell Biol. *16*, 376-383.
Liu J, Yang L, Jin M, Xu L, Wu S (2011a). regulation of the invasion and metastasis of human glioma cells by polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. Mol. Med. Rep. *4*, 1299-1305.
Liu T, Jin X, Zhang X, Yuan H, Cheng J, Lee J, Zhang B, Zhang M, Wu J, Wang L, Tian G, Wang W (2012). A novel missense SNRNP200 mutation associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Chinese family. PLoS. ONE. *7*, e45464.
Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R, Krischek B, Zou L, Kim JE, Kitakaze M, Miyamoto S, Nagata K, Hashimoto N, Koizumi A (2011b). Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. PLoS. ONE. *6*, e22542.
Lleres D, Denegri M, Biggiogera M, Ajuh P, Lamond AI (2010). Direct interaction between hnRNP-M and CDC5L/PLRG1 proteins affects alternative splice site choice. EMBO Rep. *11*, 445-451.
Lu D, Yang X, Jiang NY, Woda BA, Liu Q, Dresser K, Mercurio AM, Rock KL, Jiang Z (2011). IMP3, a new biomarker to predict progression of cervical intraepithelial neoplasia into invasive cancer. Am. J Surg. Pathol. *35*, 1638-1645.
Lu Z, Zhou L, Killela P, Rasheed AB, Di C, Poe WE, McLendon RE, Bigner DD, Nicchitta C, Yan H (2009). Glioblastoma proto-oncogene SEC61gamma is required for tumor cell survival and response to endoplasmic reticulum stress. Cancer Res. *69*, 9105-9111.
Lugassy C, Torres-Munoz JE, Kleinman HK, Ghanem G, Vernon S, Barnhill RL (2009). Overexpression of malignancy-associated laminins and laminin receptors by angiotropic human melanoma cells in a chick chorioallantoic membrane model. J Cutan. Pathol. *36*, 1237-1243.
Ma LJ, Li W, Zhang X, Huang DH, Zhang H, Xiao JY, Tian YQ (2009). Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. Arch. Med Res *40*, 114-123.
Ma TS, Mann DL, Lee JH, Gallinghouse GJ (1999). SR compartment calcium and cell apoptosis in SERCA overexpression. Cell Calcium *26*, 25-36.
Ma Y, Lin D, Sun W, Xiao T, Yuan J, Han N, Guo S, Feng X, Su K, Mao Y, Cheng S, Gao Y (2006). Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant

transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. Clin Cancer Res *12*, 1121-1127.
MacLennan DH, Rice WJ, Green NM (1997). The mechanism of Ca2+ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPases. J Biol. Chem. *272*, 28815-28818.
Maeder C, Kutach AK, Guthrie C (2009). ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. Nat Struct. Mol. Biol. *16*, 42-48.
Manda R, Kohno T, Niki T, Yamada T, Takenoshita S, Kuwano H, Yokota J (2000). Differential expression of the LAMB3 and LAMC2 genes between small cell and non-small cell lung carcinomas. Biochem. Biophys. Res. Commun. *275*, 440-445.
Marchand M, Van BN, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De GJ, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der BP, Boon T (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. Int. J. Cancer *80*, 219-230.
Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y, . (1995). Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. Int. J Cancer *63*, 883-885.
Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA (2006). Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol *291*, G45-G54.
McManus KJ, Barrett IJ, Nouhi Y, Hieter P (2009). Specific synthetic lethal killing of RAD54B-deficient human colorectal cancer cells by FEN1 silencing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *106*, 3276-3281.
Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. Autophagy. *5*, 649-662.
Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S, Chouchane L (2001). Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. Cancer *91*, 672-678.
Meyer EL, Goemann IM, Dora JM, Wagner MS, Maia AL (2008). Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in medullary thyroid carcinoma. Mol. Cell Endocrinol. *289*, 16-22.
Miller NH, Justice CM, Marosy B, Swindle K, Kim Y, Roy-Gagnon MH, Sung H, Behneman D, Doheny KF, Pugh E, Wilson AF (2012). Intra-familial tests of association between familial idiopathic scoliosis and linked regions on 9q31.3-q34.3 and 16p12.3-q22.2. Hum. Hered. *74*, 36-44.
Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, Hope C, Holcombe RF (2004). Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. Int. J Oncol *25*, 1337-1342.
Mochizuki S, Okada Y (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. Cancer Sci. *98*, 621-628.
Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. Science.

Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL (1997). HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation *64*, 1017-1027.
Moroy G, Alix AJ, Sapi J, Hornebeck W, Bourguet E (2012). Neutrophil elastase as a target in lung cancer. Anticancer Agents Med. Chem. *12*, 565-579.
Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER (2010). Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. Oncogene *29*, 2104-2117.
Moss DK, Wilde A, Lane JD (2009). Dynamic release of nuclear RanGTP triggers TPX2-dependent microtubule assembly during the apoptotic execution phase. J Cell Sci. *122*, 644-655.
Murakami M, Araki O, Morimura T, Hosoi Y, Mizuma H, Yamada M, Kurihara H, Ishiuchi S, Tamura M, Sasaki T, Mori M (2000). Expression of type II iodothyronine deiodinase in brain tumors. J Clin Endocrinol. Metab *85*, 4403-4406.
Nakamura Y, Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sakai D, Mochida J, Hotta T, Ando K (2006). Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. Br. J Dermatol. *154*, 1062-1070.
Neidert MC, Schoor O, Trautwein C, Trautwein N, Christ L, Melms A, Honegger J, Rammensee HG, Herold-Mende C, Dietrich PY, Stevanovic S (2012). Natural HLA class I ligands from glioblastoma: extending the options for immunotherapy. J Neurooncol.
Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. Nat Med. *4*, 328-332.
Niedergethmann M, Alves F, Neff JK, Heidrich B, Aramin N, Li L, Pilarsky C, Grutzmann R, Allgayer H, Post S, Gretz N (2007). Gene expression profiling of liver metastases and tumour invasion in pancreatic cancer using an orthotopic SCID mouse model. Br. J Cancer *97*, 1432-1440.
Nikolova DN, Zembutsu H, Sechanov T, Vidinov K, Kee LS, Ivanova R, Becheva E, Kocova M, Toncheva D, Nakamura Y (2008). Genome-wide gene expression profiles of thyroid carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of thyroid carcinoma. Oncol Rep. *20*, 105-121.
Nirde P, Derocq D, Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gary-Bobo M, Garcia M (2010). Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. Oncogene *29*, 117-127.
Nishinakamura R, Uchiyama Y, Sakaguchi M, Fujimura S (2011). Nephron progenitors in the metanephric mesenchyme. Pediatr. Nephrol. *26*, 1463-1467.
Odermatt A, Taschner PE, Khanna VK, Busch HF, Karpati G, Jablecki CK, Breuning MH, MacLennan DH (1996). Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase, are associated with Brody disease. Nat Genet. *14*, 191-194.
Oh SP, Taylor RW, Gerecke DR, Rochelle JM, Seldin MF, Olsen BR (1992). The mouse alpha 1(XII) and human alpha 1(XII)-like collagen genes are localized on mouse chromosome 9 and human chromosome 6. Genomics *14*, 225-231.
Ohta S, Koide M, Tokuyama T, Yokota N, Nishizawa S, Namba H (2001). Cdc6 expression as a marker of proliferative activity in brain tumors. Oncol Rep. *8*, 1063-1066.
Ortega P, Moran A, Fernandez-Marcelo T, De JC, Frias C, Lopez-Asenjo JA, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Diaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M (2010). MMP-7 and SGCE as

distinctive molecular factors in sporadic colorectal cancers from the mutator phenotype pathway. Int. J Oncol *36*, 1209-1215.
Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *21*, 529-550.
Pascolo S, Ginhoux F, Laham N, Walter S, Schoor O, Probst J, Rohrlich P, Obermayr F, Fisch P, Danos O, Ehrlich R, Lemonnier FA, Rammensee HG (2005). The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells. Int. Immunol. *17*, 117-122.
Pascreau G, Eckerdt F, Lewellyn AL, Prigent C, Maller JL (2009). Phosphorylation of p53 is regulated by TPX2-Aurora A in xenopus oocytes. J Biol. Chem. *284*, 5497-5505.
Patterson CE, Abrams WR, Wolter NE, Rosenbloom J, Davis EC (2005). Developmental regulation and coordinate reexpression of FKBP65 with extracellular matrix proteins after lung injury suggest a specialized function for this endoplasmic reticulum immunophilin. Cell Stress. Chaperones. *10*, 285-295.
Patterson CE, Schaub T, Coleman EJ, Davis EC (2000). Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. Mol. Biol. Cell *11*, 3925-3935.
Peiro G, Diebold J, Baretton GB, Kimmig R, Lohrs U (2001). Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome. Int. J Gynecol. Pathol. *20*, 359-367.
Peng C, Togayachi A, Kwon YD, Xie C, Wu G, Zou X, Sato T, Ito H, Tachibana K, Kubota T, Noce T, Narimatsu H, Zhang Y (2010). Identification of a novel human UDP-GalNAc transferase with unique catalytic activity and expression profile. Biochem. Biophys. Res. Commun. *402*, 680-686.
Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, Ratnam K (2000). Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. Biochem. J *351*, 67-77.
Perrin-Tricaud C, Rutschmann C, Hennet T (2011). Identification of domains and amino acids essential to the collagen galactosyltransferase activity of GLT25D1. PLoS. ONE. *6*, e29390.
Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, Chaturvedi AK, Katki HA, Zheng YL, Bowman ED, Engels EA, Caporaso NE, Harris CC (2011). Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. J Natl. Cancer Inst. *103*, 1112-1122.
Piskac-Collier AL, Monroy C, Lopez MS, Cortes A, Etzel CJ, Greisinger AJ, Spitz MR, El-Zein RA (2011). Variants in folate pathway genes as modulators of genetic instability and lung cancer risk. Genes Chromosomes. Cancer *50*, 1-12.
Pontisso P, Calabrese F, Benvegnu L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fassina G (2004). Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. Br. J Cancer *90*, 833-837.
Prades C, Arnould I, Annilo T, Shulenin S, Chen ZQ, Orosco L, Triunfol M, Devaud C, Maintoux-Larois C, Lafargue C, Lemoine C, Denefle P, Rosier M, Dean M (2002). The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058 amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon. Cytogenet. Genome Res *98*, 160-168.
Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, Thelma BK (2010). Association analysis of ADPRT1, AKR1B1, RAGE, GFPT2 and PAI-1 gene

polymorphisms with chronic renal insufficiency among Asian Indians with type-2 diabetes. BMC. Med. Genet. *11*, 52.
Puppin C, Fabbro D, Dima M, Di LC, Puxeddu E, Filetti S, Russo D, Damante G (2008). High periostin expression correlates with aggressiveness in papillary thyroid carcinomas. J Endocrinol. *197*, 401-408.
Purdue MP, Johansson M, Zelenika D, Toro JR, Scelo G, Moore LE, Prokhortchouk E, Wu X, Kiemeney LA, Gaborieau V, Jacobs KB, Chow WH, Zaridze D, Matveev V, Lubinski J, Trubicka J, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Bucur A, Bencko V, Foretova L, Janout V, Boffetta P, Colt JS, Davis FG, Schwartz KL, Banks RE, Selby PJ, Harnden P, Berg CD, Hsing AW, Grubb RL, III, Boeing H, Vineis P, Clavel-Chapelon F, Palli D, Tumino R, Krogh V, Panico S, Duell EJ, Quiros JR, Sanchez MJ, Navarro C, Ardanaz E, Dorronsoro M, Khaw KT, Allen NE, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Trichopoulos D, Linseisen J, Ljungberg B, Overvad K, Tjonneland A, Romieu I, Riboli E, Mukeria A, Shangina O, Stevens VL, Thun MJ, Diver WR, Gapstur SM, Pharoah PD, Easton DF, Albanes D, Weinstein SJ, Virtamo J, Vatten L, Hveem K, Njolstad I, Tell GS, Stoltenberg C, Kumar R, Koppova K, Cussenot O, Benhamou S, Oosterwijk E, Vermeulen SH, Aben KK, van der Marel SL, Ye Y, Wood CG, Pu X, Mazur AM, Boulygina ES, Chekanov NN, Foglio M, Lechner D, Gut I, Heath S, Blanche H, Hutchinson A, Thomas G, Wang Z, Yeager M, Fraumeni JF, Jr., Skryabin KG, McKay JD, Rothman N, Chanock SJ, Lathrop M, Brennan P (2011). Genome-wide association study of renal cell carcinoma identifies two susceptibility loci on 2p21 and 11q13.3. Nat Genet. *43*, 60-65.
Puyol M, Martin A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, Guerra C, Santamaria D, Barbacid M (2010). A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. Cancer Cell *18*, 63-73.
Qu P, Du H, Wang X, Yan C (2009). Matrix metalloproteinase 12 overexpression in lung epithelial cells plays a key role in emphysema to lung bronchioalveolar adenocarcinoma transition. Cancer Res *69*, 7252-7261.
Ramakrishna M, Williams LH, Boyle SE, Bearfoot JL, Sridhar A, Speed TP, Gorringe KL, Campbell IG (2010). Identification of candidate growth promoting genes in ovarian cancer through integrated copy number and expression analysis. PLoS. ONE. *5*, e9983.
Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics *50*, 213-219.
Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). MHC Ligands and Peptide Motifs. (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
Rao B, Gao Y, Huang J, Gao X, Fu X, Huang M, Yao J, Wang J, Li W, Zhang J, Liu H, Wang L, Wang J (2011). Mutations of p53 and K-ras correlate TF expression in human colorectal carcinomas: TF downregulation as a marker of poor prognosis. Int. J Colorectal Dis. *26*, 593-601.
Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. Genome Res. *12*, 1231-1245.
Rauch J, O'Neill E, Mack B, Matthias C, Munz M, Kolch W, Gires O (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H blocks MST2-mediated apoptosis in cancer cells by regulating A-Raf transcription. Cancer Res. *70*, 1679-1688.
Rege TA, Hagood JS (2006a). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. FASEB J *20*, 1045-1054.

Rege TA, Hagood JS (2006b). Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. Biochim. Biophys. Acta *1763*, 991-999.
Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Ozer HL, Schwab M, Albino AP, Old LJ (1993). Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. Cancer Res *53*, 3327-3335.
Rettig WJ, Su SL, Fortunato SR, Scanlan MJ, Raj BK, Garin-Chesa P, Healey JH, Old LJ (1994). Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors. Int J Cancer *58*, 385-392.
Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ (2006). Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy. Cancer *107*, 67-74.
Ripka S, Konig A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, Downward J, Gress T, Michl P (2007). WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. Carcinogenesis *28*, 1178-1187.
Rivera VT, Boudoukha S, Simon A, Souidi M, Cuvellier S, Pinna G, Polesskaya A (2013). Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization. Oncogene.
Rodningen OK, Borresen-Dale AL, Alsner J, Hastie T, Overgaard J (2008). Radiation-induced gene expression in human subcutaneous fibroblasts is predictive of radiation-induced fibrosis. Radiother. Oncol *86*, 314-320.
Rodriguez CI, Stewart CL (2007). Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. Dev. Biol. *312*, 501-508.
Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Roigas J, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K, Lichtinghagen R (2004a). Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. Oncol Rep. *11*, 529-536.
Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Stephan C, Roigas J, Kristiansen G, Loening SA, Lichtinghagen R, Jung K (2004b). The membrane proteases adams and hepsin are differentially expressed in renal cell carcinoma. Are they potential tumor markers? J Urol. *172*, 2162-2166.
Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. Genes Dev. *19*, 570-582.
Romagnoli S, Fasoli E, Vaira V, Falleni M, Pellegrini C, Catania A, Roncalli M, Marchetti A, Santambrogio L, Coggi G, Bosari S (2009). Identification of potential therapeutic targets in malignant mesothelioma using cell-cycle gene expression analysis. Am J Pathol. *174*, 762-770.
Romero-Weaver AL, Wang HW, Steen HC, Scarzello AJ, Hall VL, Sheikh F, Donnelly RP, Gamero AM (2010). Resistance to IFN-alpha-induced apoptosis is linked to a loss of STAT2. Mol. Cancer Res. *8*, 80-92.
Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, . (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. N. Engl. J. Med. *316*, 889-897.
Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, . (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N. Engl. J Med *319*, 1676-1680.

Ruan K, Bao S, Ouyang G (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. Cell Mol. Life Sci. *66*, 2219-2230.
Ruiz dA, I, Scarselli M, Rosemond E, Gautam D, Jou W, Gavrilova O, Ebert PJ, Levitt P, Wess J (2010). RGS4 is a negative regulator of insulin release from pancreatic beta-cells *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A *107*, 7999-8004.
Rusin M, Zientek H, Krzesniak M, Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S, Butkiewicz D, Vaitiekunaite R, Lisowska K, Grzybowska E, Krawczyk Z (2004). Intronic polymorphism (1541-1542delGT) of the constitutive heat shock protein 70 gene has functional significance and shows evidence of association with lung cancer risk. Mol. Carcinog. *39*, 155-163.
Sagara N, Toda G, Hirai M, Terada M, Katoh M (1998). Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7. Biochem. Biophys. Res. Commun. *252*, 117-122.
Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science *239*, 487-491.
Sakuntabhai A, Ruiz-Perez V, Carter S, Jacobsen N, Burge S, Monk S, Smith M, Munro CS, O'Donovan M, Craddock N, Kucherlapati R, Rees JL, Owen M, Lathrop GM, Monaco AP, Strachan T, Hovnanian A (1999). Mutations in ATP2A2, encoding a Ca2+ pump, cause Darier disease. Nat Genet. *21*, 271-277.
Samanta S, Sharma VM, Khan A, Mercurio AM (2012). Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta: implications for triple-negative breast cancer. Oncogene *31*, 4689-4697.
Sang QX (1998). Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. Cell Res *8*, 171-177.
Sarai N, Kagawa W, Fujikawa N, Saito K, Hikiba J, Tanaka K, Miyagawa K, Kurumizaka H, Yokoyama S (2008). Biochemical analysis of the N-terminal domain of human RAD54B. Nucleic Acids Res. *36*, 5441-5450.
Satow R, Shitashige M, Kanai Y, Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T (2010). Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res *16*, 2518-2528.
Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JH, Old LJ, Rettig WJ (1994). Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A *91*, 5657-5661.
Schafer R, Sedehizade F, Welte T, Reiser G (2003). ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol *285*, L376-L385.
Schegg B, Hulsmeier AJ, Rutschmann C, Maag C, Hennet T (2009). Core glycosylation of collagen is initiated by two beta(1-O)galactosyltransferases. Mol. Cell Biol. *29*, 943-952.
Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, Fehm T, Solomayer E, Riess O, Wallwiener D, Kurek R, Neubauer HJ (2006). Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. Cancer Res *66*, 5278-5286.
Scieglinska D, Piglowski W, Mazurek A, Malusecka E, Zebracka J, Filipczak P, Krawczyk Z (2008). The HspA2 protein localizes in nucleoli and centrosomes of heat shocked cancer cells. J Cell Biochem. *104*, 2193-2206.

Seifert W, Kuhnisch J, Maritzen T, Horn D, Haucke V, Hennies HC (2011). Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. J Biol. Chem. *286*, 37665-37675.
Shaulian E (2010). AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? Cell Signal. *22*, 894-899.
Shaulian E, Karin M (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol. *4*, E131-E136.
Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ (2003). Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. Cancer Cell *3*, 377-386.
Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, Higashikawa K, Kamata N (2009). Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. Int J Oncol *34*, 1565-1571.
Shimbo T, Tanemura A, Yamazaki T, Tamai K, Katayama I, Kaneda Y (2010). Serum anti-BPAG1 auto-antibody is a novel marker for human melanoma. PLoS. ONE. *5*, e10566.
Shyian M, Gryshkova V, Kostianets O, Gorshkov V, Gogolev Y, Goncharuk I, Nespryadko S, Vorobjova L, Filonenko V, Kiyamova R (2011). Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors. Exp. Oncol *33*, 94-98.
Siddiqui N, Borden KL (2012). mRNA export and cancer. Wiley. Interdiscip. Rev. RNA. *3*, 13-25.
Simpson NE, Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP (2012). An *in vitro* investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression. Breast Cancer Res. Treat. *133*, 959-968.
Singh-Jasuja H, Emmerich NP, Rammensee HG (2004). The Tubingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. Cancer Immunol. Immunother. *53*, 187-195.
Siow DL, Wattenberg BW (2012). Mammalian ORMDL proteins mediate the feedback response in ceramide biosynthesis. J Biol. Chem. *287*, 40198-40204.
Slack FJ, Weidhaas JB (2008). MicroRNA in cancer prognosis. N. Engl. J Med. *359*, 2720-2722.
Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM (2006). Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. J Clin Oncol. *24*, 3089-3094.
Smith MJ, Culhane AC, Donovan M, Coffey JC, Barry BD, Kelly MA, Higgins DG, Wang JH, Kirwan WO, Cotter TG, Redmond HP (2009a). Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification. Br. J Cancer *100*, 1452-1464.
Smith SC, Nicholson B, Nitz M, Frierson HF, Jr., Smolkin M, Hampton G, El-Rifai W, Theodorescu D (2009b). Profiling bladder cancer organ site-specific metastasis identifies LAMC2 as a novel biomarker of hematogenous dissemination. Am J Pathol. *174*, 371-379.
Sohr S, Engeland K (2008). RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53. Cell Cycle *7*, 3448-3460.
Somers GR, Bradbury R, Trute L, Conigrave A, Venter DJ (1999). Expression of the human P2Y6 nucleotide receptor in normal placenta and gestational trophoblastic disease. Lab Invest *79*, 131-139.

Srougi MC, Burridge K (2011). The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. PLoS. ONE. *6*, e17108.
Staehler M, Stenzl A, Dietrich PY, Eisen T, Haferkamp A, Beck J, Mayer A, Walter S, Singh-Jasuja H, Stief C (2007). A phase I study to evaluate safety, immunogenicity and anti-tumor activity of the multi-peptide vaccine IMA901 in renal cell carcinoma patients (RCC). Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, *Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 5098* (Abstract).
Starzyk RM, Rosenow C, Frye J, Leismann M, Rodzinski E, Putney S, Tuomanen EI (2000). Cerebral cell adhesion molecule: a novel leukocyte adhesion determinant on blood-brain barrier capillary endothelium. J Infect. Dis. *181*, 181-187.
Steckelbroeck S, Jin Y, Gopishetty S, Oyesanmi B, Penning TM (2004). Human cytosolic 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. J Biol. Chem. *279*, 10784-10795.
Stewart DJ (2010). Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. Crit Rev. Oncol Hematol. *75*, 173-234.
Stuart JE, Lusis EA, Scheck AC, Coons SW, Lal A, Perry A, Gutmann DH (2010). Identification of Gene Markers Associated With Aggressive Meningioma by Filtering Across Multiple Sets of Gene Expression Arrays. J Neuropathol. Exp. Neurol.
Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, Kato H (1991). Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. *181*, 51-58.
Sunaga N, Imai H, Shimizu K, Shames DS, Kakegawa S, Girard L, Sato M, Kaira K, Ishizuka T, Gazdar AF, Minna JD, Mori M (2012). Oncogenic KRAS-induced interleukin-8 overexpression promotes cell growth and migration and contributes to aggressive phenotypes of non-small cell lung cancer. Int. J Cancer *130*, 1733-1744.
Sutherlin ME, Nishimori I, Caffrey T, Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mack D, Iwamura T, Clausen H, Hollingsworth MA (1997). Expression of three UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyltransferases in adenocarcinoma cell lines. Cancer Res. *57*, 4744-4748.
Suvasini R, Shruti B, Thota B, Shinde SV, Friedmann-Morvinski D, Nawaz Z, Prasanna KV, Thennarasu K, Hegde AS, Arivazhagan A, Chandramouli BA, Santosh V, Somasundaram K (2011). Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2. J Biol. Chem. *286*, 25882-25890.
Tai CJ, Shen SC, Lee WR, Liao CF, Deng WP, Chiou HY, Hsieh CI, Tung JN, Chen CS, Chiou JF, Li LT, Lin CY, Hsu CH, Jiang MC (2010). Increased cellular apoptosis susceptibility (CSE1L/CAS) protein expression promotes protrusion extension and enhances migration of MCF-7 breast cancer cells. Exp. Cell Res. *316*, 2969-2981.
Takanami I, Abiko T, Koizumi S (2008). Expression of periostin in patients with non-small cell lung cancer: correlation with angiogenesis and lymphangiogenesis. Int J Biol. Markers *23*, 182-186.
Tanaka S, Akiyoshi T, Mori M, Wands JR, Sugimachi K (1998). A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/beta-catenin signals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *95*, 10164-10169.
Tanaka T, Ohkubo S, Tatsuno I, Prives C (2007). hCAS/CSE1L associates with chromatin and regulates expression of select p53 target genes. Cell *130*, 638-650.

Terabayashi T, Sakaguchi M, Shinmyozu K, Ohshima T, Johjima A, Ogura T, Miki H, Nishinakamura R (2012). Phosphorylation of Kif26b promotes its polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation during kidney development. PLoS. ONE. *7*, e39714.
Terry KL, Vitonis AF, Hernandez D, Lurie G, Song H, Ramus SJ, Titus-Ernstoff L, Carney ME, Wilkens LR, Gentry-Maharaj A, Menon U, Gayther SA, Pharaoh PD, Goodman MT, Cramer DW, Birrer MJ (2010). A polymorphism in the GALNT2 gene and ovarian cancer risk in four population based case-control studies. Int. J Mol. Epidemiol. Genet. *1*, 272-277.
Thierry L, Geiser AS, Hansen A, Tesche F, Herken R, Miosge N (2004). Collagen types XII and XIV are present in basement membrane zones during human embryonic development. J Mol. Histol. *35*, 803-810.
Thorsen K, Sorensen KD, Brems-Eskildsen AS, Modin C, Gaustadnes M, Hein AM, Kruhoffer M, Laurberg S, Borre M, Wang K, Brunak S, Krainer AR, Torring N, Dyrskjot L, Andersen CL, ORntoft TF (2008). Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis. Mol. Cell Proteomics. *7*, 1214-1224.
Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den DP, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. J Exp. Med *190*, 1669-1678.
Timar J, Kasler M, Katai J, Soos M, Mathiasz D, Romany A, Patthy L, Kovacs G, Jozsa A, Szilak L, Forrai T (2006). [Developments in cancer management by innovative genomics. 2006 report of the National Cancer Consortium]. Magy. Onkol. *50*, 349-359.
Tischler V, Fritzsche FR, Wild PJ, Stefan C, Seifert HH, Riener MO, Hermanns T, Mortezavi A, Gerhardt J, Schraml P, Jung K, Moch H, Soltermann A, Kristiansen G (2010). Periostin is up-regulated in high grade and high stage prostate cancer. BMC. Cancer *10*, 273.
Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Keiser AR, Wert SE, Bruno MD, Whitsett JA (2011). Sox2 activates cell proliferation and differentiation in the respiratory epithelium. Am J Respir. Cell Mol. Biol. *45*, 101-110.
Tondreau T, Dejeneffe M, Meuleman N, Stamatopoulos B, Delforge A, Martiat P, Bron D, Lagneaux L (2008). Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. BMC. Genomics *9*, 166.
Tong L, Harwood HJ, Jr. (2006). Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. J Cell Biochem. *99*, 1476-1488.
Tong WG, Wierda WG, Lin E, Kuang SQ, Bekele BN, Estrov Z, Wei Y, Yang H, Keating MJ, Garcia-Manero G (2010). Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. Epigenetics. *5*, 499-508.
Torre GC (1998). SCC antigen in malignant and nonmalignant squamous lesions. Tumour. Biol. *19*, 517-526.
Tritz R, Hickey MJ, Lin AH, Hadwiger P, Sah DW, Neuwelt EA, Mueller BM, Kruse CA (2009). FAPP2 gene downregulation increases tumor cell sensitivity to Fas-induced apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *383*, 167-171.
Tsai JR, Chong IW, Chen YH, Yang MJ, Sheu CC, Chang HC, Hwang JJ, Hung JY, Lin SR (2007). Differential expression profile of MAGE family in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer *56*, 185-192.

Tseng H (1998). Basonuclin, a zinc finger protein associated with epithelial expansion and proliferation. Front Biosci. *3*, D985-D988.
Tseng H, Biegel JA, Brown RS (1999). Basonuclin is associated with the ribosomal RNA genes on human keratinocyte mitotic chromosomes. J Cell Sci. *112 Pt 18*, 3039-3047.
Tseng H, Green H (1994). Association of basonuclin with ability of keratinocytes to multiply and with absence of terminal differentiation. J Cell Biol. *126*, 495-506.
Tsuji A, Kikuchi Y, Sato Y, Koide S, Yuasa K, Nagahama M, Matsuda Y (2006). A proteomic approach reveals transient association of reticulocalbin-3, a novel member of the CREC family, with the precursor of subtilisin-like proprotein convertase, PACE4. Biochem. J *396*, 51-59.
Tsukamoto Y, Uchida T, Karnan S, Noguchi T, Nguyen LT, Tanigawa M, Takeuchi I, Matsuura K, Hijiya N, Nakada C, Kishida T, Kawahara K, Ito H, Murakami K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M (2008). Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. J Pathol. *216*, 471-482.
Twarock S, Tammi MI, Savani RC, Fischer JW (2010). Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. J Biol. Chem. *285*, 23276-23284.
Twells RC, Metzker ML, Brown SD, Cox R, Garey C, Hammond H, Hey PJ, Levy E, Nakagawa Y, Philips MS, Todd JA, Hess JF (2001). The sequence and gene characterization of a 400-kb candidate region for IDDM4 on chromosome 11q13. Genomics *72*, 231-242.
Tzankov A, Strasser U, Dirnhofer S, Menter T, Arber C, Jotterand M, Rovo A, Tichelli A, Stauder R, Gunthert U (2011). In situ RHAMM protein expression in acute myeloid leukemia blasts suggests poor overall survival. Ann Hematol.
Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, Inenaga T, Inoue S, Kobayashi C, Oshima N, Kiyonari H, Nakagata N, Sato Y, Sekiguchi K, Miki H, Araki E, Fujimura S, Tanaka SS, Nishinakamura R (2010). Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *107*, 9240-9245.
Ullman E, Pan JA, Zong WX (2011). Squamous cell carcinoma antigen 1 promotes caspase-8-mediated apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress while inhibiting necrosis induced by lysosomal injury. Mol. Cell Biol. *31*, 2902-2919.
Utispan K, Thuwajit P, Abiko Y, Charngkaew K, Paupairoj A, Chau-in S, Thuwajit C (2010). Gene expression profiling of cholangiocarcinoma-derived fibroblast reveals alterations related to tumor progression and indicates periostin as a poor prognostic marker. Mol. Cancer *9*, 13.
van AM, Schepens M, de BD, Janssen B, Merkx G, Geurts van KA (2000). Construction of a 350-kb sequence-ready 11q13 cosmid contig encompassing the markers D11S4933 and D11S546: mapping of 11 genes and 3 tumor-associated translocation breakpoints. Genomics *66*, 35-42.
Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR (1998). Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. Int. J Cancer *79*, 468-475.
Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Vazquez K, Duenas A, Taja L, Mendoza P, Garcia JA, Salcedo M (2005). Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. BMC. Cancer *5*, 68.
Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. Cell *136*, 701-718.

Walchli C, Koch M, Chiquet M, Odermatt BF, Trueb B (1994). Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV. J Cell Sci. *107 (Pt 2)*, 669-681.
Wallace AM, Sandford AJ, English JC, Burkett KM, Li H, Finley RJ, Muller NL, Coxson HO, Pare PD, Abboud RT (2008). Matrix metalloproteinase expression by human alveolar macrophages in relation to emphysema. COPD. *5*, 13-23.
Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J. Immunol. *171*, 4974-4978.
Wang C, Rajput S, Watabe K, Liao DF, Cao D (2010a). Acetyl-CoA carboxylase-a as a novel target for cancer therapy. Front Biosci. (Schol. Ed) *2*, 515-526.
Wang C, Xu C, Sun M, Luo D, Liao DF, Cao D (2009a). Acetyl-CoA carboxylase-alpha inhibitor TOFA induces human cancer cell apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *385*, 302-306.
Wang HW, Lin CP, Chiu JH, Chow KC, Kuo KT, Lin CS, Wang LS (2007). Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. Int. J Cancer *120*, 2019-2027.
Wang J, Tsui HW, Beier F, Pritzker KP, Inman RD, Tsui FW (2008a). The ANKH DeltaE490Mutation in Calcium Pyrophosphate Dihydrate Crystal Deposition Disease (CPPDD) affects tissue non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP) activities. Open Rheumatol. J *2*, 23-30.
Wang KK, Liu N, Radulovich N, Wigle DA, Johnston MR, Shepherd FA, Minden MD, Tsao MS (2002). Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. Oncogene *21*, 7598-7604.
Wang Q, Traynor JR (2011). Opioid-induced down-regulation of RGS4: role of ubiquitination and implications for receptor cross-talk. J Biol. Chem. *286*, 7854-7864.
Wang SZ, Luo XG, Shen J, Zou JN, Lu YH, Xi T (2008b). Knockdown of SMYD3 by RNA interference inhibits cervical carcinoma cell growth and invasion *in vitro*. BMB. Rep. *41*, 294-299.
Wang WX, Zhang WJ, Peng ZL, Yang KX (2009b). [Expression and clinical significance of CDC6 and hMSH2 in cervical carcinoma]. Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban. *40*, 857-860.
Wang Y, Zhou F, Wu Y, Xu D, Li W, Liang S (2010b). The relationship between three heat shock protein 70 gene polymorphisms and susceptibility to lung cancer. Clin Chem. Lab Med. *48*, 1657-1663.
Warner SL, Stephens BJ, Nwokenkwo S, Hostetter G, Sugeng A, Hidalgo M, Trent JM, Han H, Von Hoff DD (2009). Validation of TPX2 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer cells. Clin Cancer Res *15*, 6519-6528.
Watanabe M, Takemasa I, Kawaguchi N, Miyake M, Nishimura N, Matsubara T, Matsuo E, Sekimoto M, Nagai K, Matsuura N, Monden M, Nishimura O (2008). An application of the 2-nitrobenzenesulfenyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma: A novel approach for biomarker discovery. Proteomics. Clin Appl. *2*, 925-935.
Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H (2011). Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. Clin Colorectal Cancer *10*, 134-141.

Watrin E, Legagneux V (2005). Contribution of hCAP-D2, a non-SMC subunit of condensin I, to chromosome and chromosomal protein dynamics during mitosis. Mol. Cell Biol. *25*, 740-750.
Watt SL, Lunstrum GP, McDonough AM, Keene DR, Burgeson RE, Morris NP (1992). Characterization of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage. J Biol. Chem. *267*, 20093-20099.
Wawrzynska L, Sakowicz A, Rudzinski P, Langfort R, Kurzyna M (2003). The conversion of thyroxine to triiodothyronine in the lung: comparison of activity of type I iodothyronine 5' deiodinase in lung cancer with peripheral lung tissues. Monaldi Arch. Chest Dis. *59*, 140-145.
Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. Cancer Cell *1*, 279-288.
Weiner L, Green H (1998). Basonuclin as a cell marker in the formation and cycling of the murine hair follicle. Differentiation *63*, 263-272.
Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S, Rammensee HG (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. Cancer Res. *62*, 5818-5827.
Wickramasinghe VO, Stewart M, Laskey RA (2010). GANP enhances the efficiency of mRNA nuclear export in mammalian cells. Nucleus. *1*, 393-396.
Wildeboer D, Naus S, my Sang QX, Bartsch JW, Pagenstecher A (2006). Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. J Neuropathol. Exp. Neurol. *65*, 516-527.
Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, Heath SC, Timpson NJ, Najjar SS, Stringham HM, Strait J, Duren WL, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai G, Swift AJ, Morken MA, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P, Hercberg S, Zelenika D, Chen WM, Li Y, Scott LJ, Scheet PA, Sundvall J, Watanabe RM, Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner AR, Collins R, Bergman RN, Uda M, Tuomilehto J, Cao A, Collins FS, Lakatta E, Lathrop GM, Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke KL, Abecasis GR (2008). Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. Nat Genet. *40*, 161-169.
Winkler GS, Mulder KW, Bardwell VJ, Kalkhoven E, Timmers HT (2006). Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription. EMBO J *25*, 3089-3099.
Wong CH, Chan H, Ho CY, Lai SK, Chan KS, Koh CG, Li HY (2009). Apoptotic histone modification inhibits nuclear transport by regulating RCC1. Nat Cell Biol. *11*, 36-45.
Wu A, Wu B, Guo J, Luo W, Wu D, Yang H, Zhen Y, Yu X, Wang H, Zhou Y, Liu Z, Fang W, Yang Z (2011a). Elevated expression of CDK4 in lung cancer. J Transl. Med. *9*, 38.
Wu GC, Hu HC, Shi MH (2008). [Expression and clinical significance of a disintegrin and metalloprotease 8 (ADAM8) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-small cell lung cancer]. Ai. Zheng. *27*, 874-878.
Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. J Biol. Chem. *275*, 36957-36965.

Wu KD, Lee WS, Wey J, Bungard D, Lytton J (1995). Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. Am. J Physiol *269*, C775-C784.
Wu SQ, Lv YE, Lin BH, Luo LM, Lv SL, Bi AH, Jia YS (2013). Silencing of periostin inhibits nicotine-mediated tumor cell growth and epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. Mol. Med. Rep. *7*, 875-880.
Wu YM, Liu CH, Hu RH, Huang MJ, Lee JJ, Chen CH, Huang J, Lai HS, Lee PH, Hsu WM, Huang HC, Huang MC (2011b). Mucin glycosylating enzyme GALNT2 regulates the malignant character of hepatocellular carcinoma by modifying the EGF receptor. Cancer Res. *71*, 7270-7279.
Wu Z, Jiang H, Zhang L, Xu X, Zhang X, Kang Z, Song D, Zhang J, Guan M, Gu Y (2012). Molecular analysis of RNF213 gene for moyamoya disease in the Chinese Han population. PLoS. ONE. *7*, e48179.
Wullner U, Neef I, Eller A, Kleines M, Tur MK, Barth S (2008). Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2. Curr. Cancer Drug Targets. *8*, 554-565.
Xia LM, Tian DA, Zhang Q, Yan W, Wang B, Liu M, Li PY, Chen B (2008). [Inhibition of HSP70-2 expression by RNA interference induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells]. Zhonghua Gan Zang. Bing. Za Zhi. *16*, 678-682.
Xiao L, Rao JN, Zou T, Liu L, Marasa BS, Chen J, Turner DJ, Passaniti A, Wang JY (2007). Induced JunD in intestinal epithelial cells represses CDK4 transcription through its proximal promoter region following polyamine depletion. Biochem. J *403*, 573-581.
Xie Y, Wolff DW, Wei T, Wang B, Deng C, Kirui JK, Jiang H, Qin J, Abel PW, Tu Y (2009). Breast cancer migration and invasion depend on proteasome degradation of regulator of G-protein signaling 4. Cancer Res *69*, 5743-5751.
Xiong D, Li G, Li K, Xu Q, Pan Z, Ding F, Vedell P, Liu P, Cui P, Hua X, Jiang H, Yin Y, Zhu Z, Li X, Zhang B, Ma D, Wang Y, You M (2012). Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. Carcinogenesis *33*, 1797-1805.
Yamada H, Yanagisawa K, Tokumaru S, Taguchi A, Nimura Y, Osada H, Nagino M, Takahashi T (2008). Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer. Genes Chromosomes. Cancer *47*, 810-818.
Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, Yasui W, Kikuchi A (2010). Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. Oncogene *29*, 2036-2046.
Yamazaki H, Nishida H, Iwata S, Dang NH, Morimoto C (2009). CD90 and CD110 correlate with cancer stem cell potentials in human T-acute lymphoblastic leukemia cells. Biochem. Biophys. Res Commun. *383*, 172-177.
Yang S, Shin J, Park KH, Jeung HC, Rha SY, Noh SH, Yang WI, Chung HC (2007). Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer. Biochim. Biophys. Acta *1772*, 1033-1040.
Yasmeen A, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C (2003). E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. Expert. Rev. Mol. Diagn. *3*, 617-633.
Yasukawa M, Ishida K, Yuge Y, Hanaoka M, Minami Y, Ogawa M, Sasaki T, Saito M, Tsuji T (2013). Dpysl4 is involved in tooth germ morphogenesis through growth regulation, polarization and differentiation of dental epithelial cells. Int. J Biol. Sci. *9*, 382-390.

Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL, Mao L, Wong DT, Zhou X (2008). Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. BMC. Genomics *9*, 69.
Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *in vivo* persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *99*, 16168-16173.
Yoon H, Liyanarachchi S, Wright FA, Davuluri R, Lockman JC, de la CA, Pellegata NS (2002). Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A *99*, 15632-15637.
Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M (2010). CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. J Cell Sci. *123*, 225-235.
Yu JM, Jun ES, Jung JS, Suh SY, Han JY, Kim JY, Kim KW, Jung JS (2007). Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells. Cancer Lett. *257*, 172-181.
Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, Senturk S, Celik E, Toylu A, Tasdemir N, Yilmaz M, Erdal E, Akcali KC, Atabey N, Ozturk M (2009). Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. Mol. Cancer *8*, 90.
Zaka R, Dion AS, Kusnierz A, Bohensky J, Srinivas V, Freeman T, Williams CJ (2009). Oxygen tension regulates the expression of ANK (progressive ankylosis) in an HIF-1-dependent manner in growth plate chondrocytes. J Bone Miner. Res. *24*, 1869-1878.
Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, Soares N, Tsang KY, Schlom J (1997). Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. Cancer Res. *57*, 4570-4577.
Zhang H, Jia Y, Cooper JJ, Hale T, Zhang Z, Elbein SC (2004). Common variants in glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and increased GFPT2 mRNA levels. J Clin Endocrinol. Metab *89*, 748-755.
Zhang J, Valianou M, Cheng JD (2010a). Identification and characterization of the promoter of fibroblast activation protein. Front Biosci. (Elite. Ed) *2*, 1154-1163.
Zhang X, Berger FG, Yang J, Lu X (2011a). USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1. EMBO J *30*, 2177-2189.
Zhang Y, Zhang G, Li J, Tao Q, Tang W (2010b). The expression analysis of periostin in human breast cancer. J Surg Res *160*, 102-106.
Zhang ZC, Satterly N, Fontoura BM, Chook YM (2011b). Evolutionary development of redundant nuclear localization signals in the mRNA export factor NXF1. Mol. Biol. Cell *22*, 4657-4668.
Zhao C, Bellur DL, Lu S, Zhao F, Grassi MA, Bowne SJ, Sullivan LS, Daiger SP, Chen LJ, Pang CP, Zhao K, Staley JP, Larsson C (2009). Autosomal-dominant retinitis pigmentosa caused by a mutation in SNRNP200, a gene required for unwinding of U4/U6 snRNAs. Am. J Hum. Genet. *85*, 617-627.
Zhao Z, Lee CC, Baldini A, Caskey CT (1995). A human homologue of the Drosophila polarity gene frizzled has been identified and mapped to 17q21.1. Genomics *27*, 370-373.
Zheng PS, Wen J, Ang LC, Sheng W, Viloria-Petit A, Wang Y, Wu Y, Kerbel RS, Yang BB (2004). Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. FASEB J *18*, 754-756.

Zhu CQ, Popova SN, Brown ER, Barsyte-Lovejoy D, Navab R, Shih W, Li M, Lu M, Jurisica I, Penn LZ, Gullberg D, Tsao MS (2007). Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *104*, 11754-11759.
Zhu JH, Hong DF, Song YM, Sun LF, Wang ZF, Wang JW (2013). Suppression of Cellular Apoptosis Susceptibility (CSE1L) Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. Asian Pac. J Cancer Prev. *14*, 1017-1021.
Zlobec I, Terracciano L, Tornillo L, Gunthert U, Vuong T, Jass JR, Lugli A (2008). Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer. Gut *57*, 1413-1419.
Zou JN, Wang SZ, Yang JS, Luo XG, Xie JH, Xi T (2009). Knockdown of SMYD3 by RNA interference down-regulates c-Met expression and inhibits cells migration and invasion induced by HGF. Cancer Lett. *280*, 78-85.
Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ (2002). Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. Oncogene *21*, 4855-4862.
Allander SV, Illei PB, Chen Y, Antonescu CR, Bittner M, Ladanyi M, Meltzer PS (2002). Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. Am. J Pathol. *161*, 1587-1595.
Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, Kumar R, Jenkins RB, de Groen PC, Roche P, van Deursen JM (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. Nat Genet. *36*, 744-749.
Balla A, Kim YJ, Varnai P, Szentpetery Z, Knight Z, Shokat KM, Balla T (2008). Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. Mol. Biol. Cell *19*, 711-721.
Barembaum M, Moreno TA, LaBonne C, Sechrist J, Bronner-Fraser M (2000). Noelin-1 is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest. Nat Cell Biol. *2*, 219-225.
Bhogaraju S, Cajanek L, Fort C, Blisnick T, Weber K, Taschner M, Mizuno N, Lamla S, Bastin P, Nigg EA, Lorentzen E (2013). Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. Science *341*, 1009-1012.
Blumental-Perry A, Haney CJ, Weixel KM, Watkins SC, Weisz OA, Aridor M (2006). Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. Dev. Cell *11*, 671-682.
Cantor JM, Ginsberg MH (2012). CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. J Cell Sci. *125*, 1373-1382.
Cave H, Suciu S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, Malet M, Boutard P, Benoit Y, Mauvieux L, Lutz P, Mechinaud F, Grardel N, Mazingue F, Dupont M, Margueritte G, Pages MP, Bertrand Y, Plouvier E, Brunie G, Bastard C, Plantaz D, Vande V, I, Hagemeijer A, Speleman F, Lessard M, Otten J, Vilmer E, Dastugue N (2004). Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. Blood *103*, 442-450.
Chadwick BP, Obermayr F, Frischauf AM (1996). Nuclear cap binding protein maps close to the xeroderma pigmentosum complementation group A (XPA) locus in human and mouse. Genomics *35*, 632-633.
Cornen S, Guille A, Adelaide J, Addou-Klouche L, Finetti P, Saade MR, Manai M,

Carbuccia N, Bekhouche I, Letessier A, Raynaud S, Charafe-Jauffret E, Jacquemier J, Spicuglia S, de TH, Viens P, Bertucci F, Birnbaum D, Chaffanet M (2014). Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. PLoS. ONE. *9*, e81843.
Dear TN, Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH (1993). The HOX11 gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *90*, 4431-4435.
Deves R, Boyd CA (2000). Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. J Membr. Biol. *173*, 165-177.
Ferrando AA, Herblot S, Palomero T, Hansen M, Hoang T, Fox EA, Look AT (2004). Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood *103*, 1909-1911.
Fry AM, Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Tanaka K, Nigg EA (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. J Cell Biol. *141*, 1563-1574.
Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C (2007). Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. Mol. Cancer Res. *5*, 1-10.
Garbarino JE, Gibbons IR (2002). Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. BMC. Genomics *3*, 18.
Gomez-Ferreria MA, Bashkurov M, Mullin M, Gingras AC, Pelletier L (2012). CEP192 interacts physically and functionally with the K63-deubiquitinase CYLD to promote mitotic spindle assembly. Cell Cycle *11*, 3555-3558.
Gomez-Ferreria MA, Rath U, Buster DW, Chanda SK, Caldwell JS, Rines DR, Sharp DJ (2007). Human Cep192 is required for mitotic centrosome and spindle assembly. Curr. Biol. *17*, 1960-1966.
Hinck L (2004). The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. Dev. Cell *7*, 783-793.
Ilboudo A, Nault JC, Dubois-Pot-Schneider H, Corlu A, Zucman-Rossi J, Samson M, Le SJ (2014). Overexpression of phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha is associated with undifferentiated status and poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. BMC. Cancer *14*, 7.
Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai Y, Nakajima T, Mori M (2009). Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. Lung Cancer *66*, 120-126.
Kataoka N, Ohno M, Kangawa K, Tokoro Y, Shimura Y (1994). Cloning of a complementary DNA encoding an 80 kilodalton nuclear cap binding protein. Nucleic Acids Res. *22*, 3861-3865.
Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C, Meltzer PS (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. Nat Med. *7*, 673-679.
Kim HJ, Cho JH, Quan H, Kim JR (2011). Down-regulation of Aurora B kinase induces cellular senescence in human fibroblasts and endothelial cells through a p53-dependent pathway. FEBS Lett. *585*, 3569-3576.
Kulkarni NH, Karavanich CA, Atchley WR, Anholt RR (2000). Characterization and differential expression of a human gene family of olfactomedin-related proteins. Genet. Res. *76*, 41-50.
Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O, Hatakeyama K, Ushio Y, Saya H, Hirota T (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in

prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. Dev. Cell *5*, 853-864.
Lampson MA, Kapoor TM (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. Nat Cell Biol. *7*, 93-98.
Latil A, Chene L, Cochant-Priollet B, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O (2003). Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. Int. J Cancer *103*, 306-315.
Lee Y, Yoon KA, Joo J, Lee D, Bae K, Han JY, Lee JS (2013). Prognostic implications of genetic variants in advanced non-small cell lung cancer: a genome-wide association study. Carcinogenesis *34*, 307-313.
Lemaitre G, Gonnet F, Vaigot P, Gidrol X, Martin MT, Tortajada J, Waksman G (2005). CD98, a novel marker of transient amplifying human keratinocytes. Proteomics. *5*, 3637-3645.
Lucker BF, Behal RH, Qin H, Siron LC, Taggart WD, Rosenbaum JL, Cole DG (2005). Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits. J Biol. Chem. *280*, 27688-27696.
Malureanu LA, Jeganathan KB, Hamada M, Wasilewski L, Davenport J, van Deursen JM (2009). BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. Dev. Cell *16*, 118-131.
Matsuura S, Matsumoto Y, Morishima K, Izumi H, Matsumoto H, Ito E, Tsutsui K, Kobayashi J, Tauchi H, Kajiwara Y, Hama S, Kurisu K, Tahara H, Oshimura M, Komatsu K, Ikeuchi T, Kajii T (2006). Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome. Am. J Med. Genet. A *140*, 358-367.
Mayor T, Hacker U, Stierhof YD, Nigg EA (2002). The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. J Cell Sci. *115*, 3275-3284.
Minogue S, Waugh MG (2012). The Phosphatidylinositol 4-Kinases: Don't Call it a Comeback. Subcell. Biochem. *58*, 1-24.
Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Ohira M, Kawarabayasi Y, Ohara O, Tanaka A, Kotani H, Miyajima N, Nomura N (1996). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. DNA Res. *3*, 321-354.
Narayan G, Goparaju C, Arias-Pulido H, Kaufmann AM, Schneider A, Durst M, Mansukhani M, Pothuri B, Murty VV (2006). Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. Mol. Cancer *5*, 16.
Pandey A, Blagoev B, Kratchmarova I, Fernandez M, Nielsen M, Kristiansen TZ, Ohara O, Podtelejnikov AV, Roche S, Lodish HF, Mann M (2002). Cloning of a novel phosphotyrosine binding domain containing molecule, Odin, involved in signaling by receptor tyrosine kinases. Oncogene *21*, 8029-8036.
Perumal D, Singh S, Yoder SJ, Bloom GC, Chellappan SP (2012). A novel five gene signature derived from stem-like side population cells predicts overall and recurrence-free survival in NSCLC. PLoS. ONE. *7*, e43589.
Pokrovskaya ID, Willett R, Smith RD, Morelle W, Kudlyk T, Lupashin VV (2011). Conserved oligomeric Golgi complex specifically regulates the maintenance of Golgi glycosylation machinery. Glycobiology *21*, 1554-1569.
Qian Y, Fritzsch B, Shirasawa S, Chen CL, Choi Y, Ma Q (2001). Formation of brainstem (nor)adrenergic centers and first-order relay visceral sensory neurons is

dependent on homeodomain protein Rnx/Tlx3. Genes Dev. *15*, 2533-2545.
Reynders E, Foulquier F, Leao TE, Quelhas D, Morelle W, Rabouille C, Annaert W, Matthijs G (2009). Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. Hum. Mol. Genet. *18*, 3244-3256.
Schmid BC, Rezniczek GA, Fabjani G, Yoneda T, Leodolter S, Zeillinger R (2007). The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat. *106*, 333-342.
Sharma G, Mirza S, Prasad CP, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R (2007). Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients. Life Sci. *80*, 1873-1881.
Shin J, Gu C, Park E, Park S (2007). Identification of phosphotyrosine binding domain-containing proteins as novel downstream targets of the EphA8 signaling function. Mol. Cell Biol. *27*, 8113-8126.
Suzuki M, Shiraishi K, Eguchi A, Ikeda K, Mori T, Yoshimoto K, Ohba Y, Yamada T, Ito T, Baba Y, Baba H (2013). Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. Oncol Rep. *29*, 1308-1314.
Ungar D, Oka T, Brittle EE, Vasile E, Lupashin VV, Chatterton JE, Heuser JE, Krieger M, Waters MG (2002). Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. J Cell Biol. *157*, 405-415.
Ungar D, Oka T, Vasile E, Krieger M, Hughson FM (2005). Subunit architecture of the conserved oligomeric Golgi complex. J Biol. Chem. *280*, 32729-32735.
Whyte JR, Munro S (2001). The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. Dev. Cell *1*, 527-537.
Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Siu NS, Chan SC, Ho TW, Wong KW, Yu MY, Wang VW, Li C, Gardner GJ, Bonome T, Johnson WB, Smith DI, Chung TK, Birrer MJ (2007). Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling. Oncogene *26*, 1971-1982.
Wu L, Chang W, Zhao J, Yu Y, Tan X, Su T, Zhao L, Huang S, Liu S, Cao G (2010). Development of autoantibody signatures as novel diagnostic biomarkers of non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. *16*, 3760-3768.
Bobos M, Hytiroglou P, Kostopoulos I, Karkavelas G, Papadimitriou CS (2006). Immunohistochemical distinction between merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. Am. J Dermatopathol. 28, 99-104.
Mena H, Morrison AL, Jones RV, Gyure KA (2001). Central neurocytomas express photoreceptor differentiation. Cancer 91, 136-143.
Schleicher RL, Hunter SB, Zhang M, Zheng M, Tan W, Bandea CI, Fallon MT, Bostwick DG, Varma VA (1997). Neurofilament heavy chain-like messenger RNA and protein are present in benign prostate and down-regulated in prostatic carcinoma. Cancer Res. 57, 3532-3536.
Segal A, Carello S, Caterina P, Papadimitriou JM, Spagnolo DV (1994). Gastrointestinal autonomic nerve tumors: a clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of 10 cases. Pathology 26, 439-447.
Szebenyi G, Smith GM, Li P, Brady ST (2002). Overexpression of neurofilament H disrupts normal cell structure and function. J Neurosci. Res. 68, 185-198.
Tanaka Y, Ijiri R, Kato K, Kato Y, Misugi K, Nakatani Y, Hara M (2000). HMB-45/melan-A and smooth muscle actin-positive clear-cell epithelioid tumor arising in the

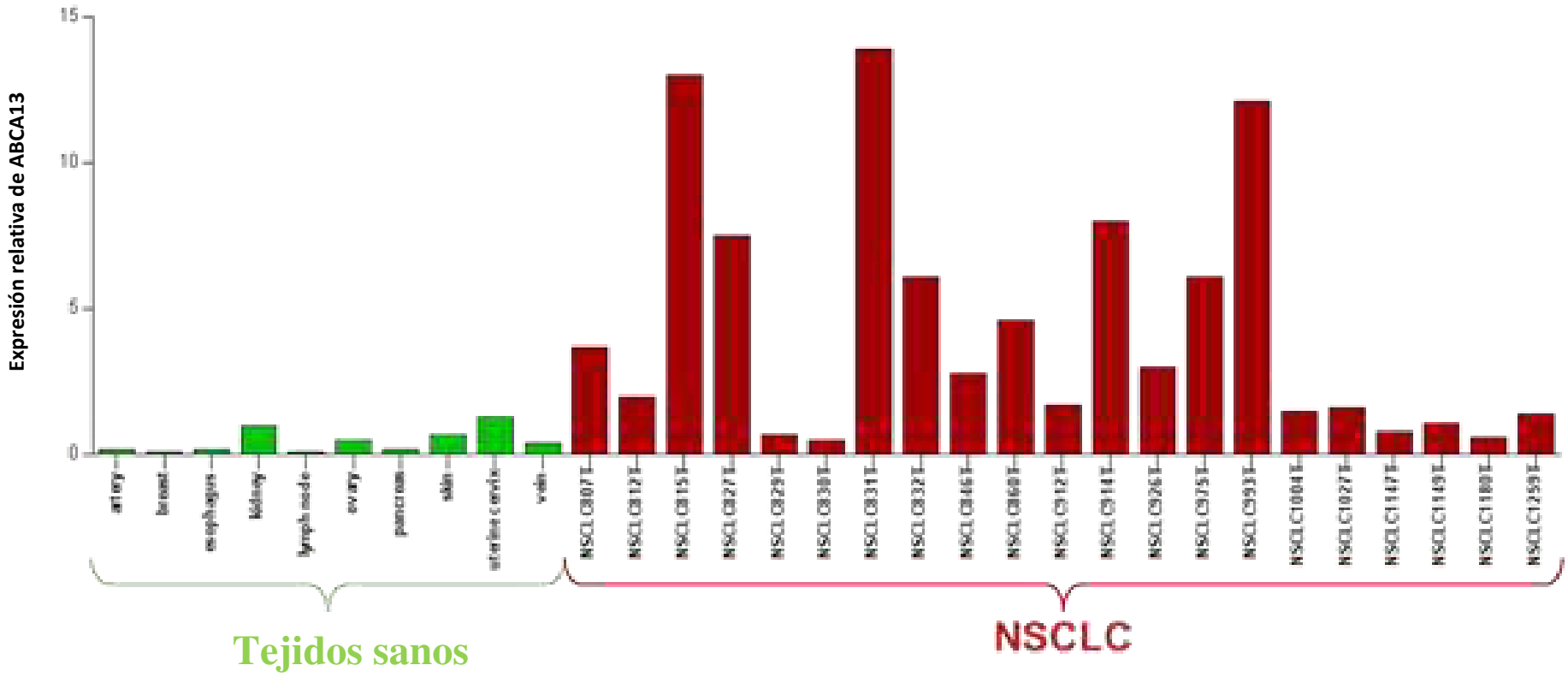
ligamentum teres hepatis: additional example of clear cell 'sugar' tumors. Am. J Surg. Pathol. 24, 1295-1299.

I32387WO-C

Resumen

La presente invención se refiere a péptidos, ácidos nucleicos y células para la utilización en métodos inmunoterapéuticos. En concreto, la presente invención se refiere a la inmunoterapia contra el cáncer. La presente invención se refiere, además, a epítopos peptídicos de linfocitos T citotóxicos (CTL) asociados a tumor, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumor que sirven como principios activos farmacéuticos de composiciones vacunales que estimulan respuestas inmunitarias antitumorales. La presente invención se refiere a nuevas secuencias peptídicas y sus variantes derivadas de moléculas HLA de clase I y clase II de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales.

Figura 2a:



Artery = arteria
Breast = mama
Esophagus = esófago
Kidney = riñón
Lymph node = nódulo linfático
Ovary = ovario
Pancreas = páncreas
Skin = piel
Uterine cervix = cuello uterino
Vein = vena

Figura 2b:

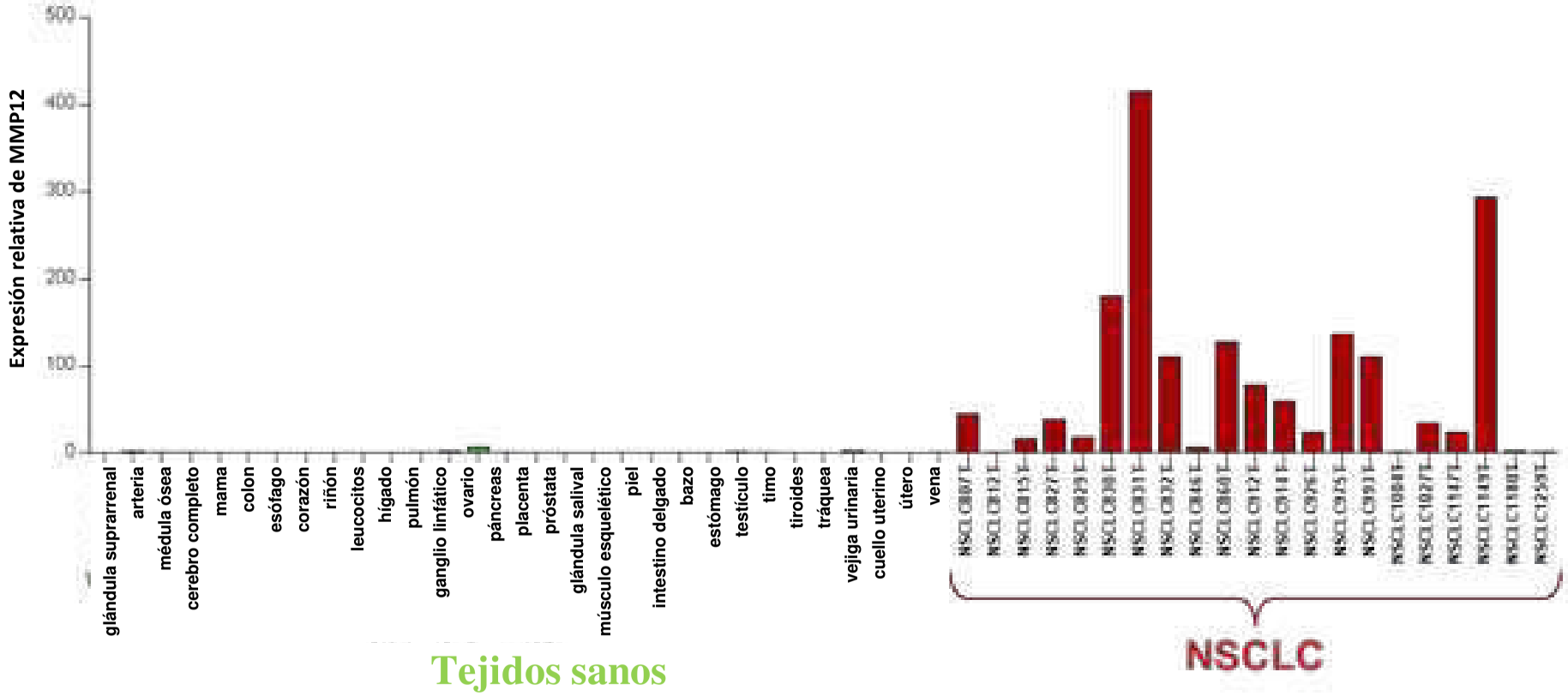
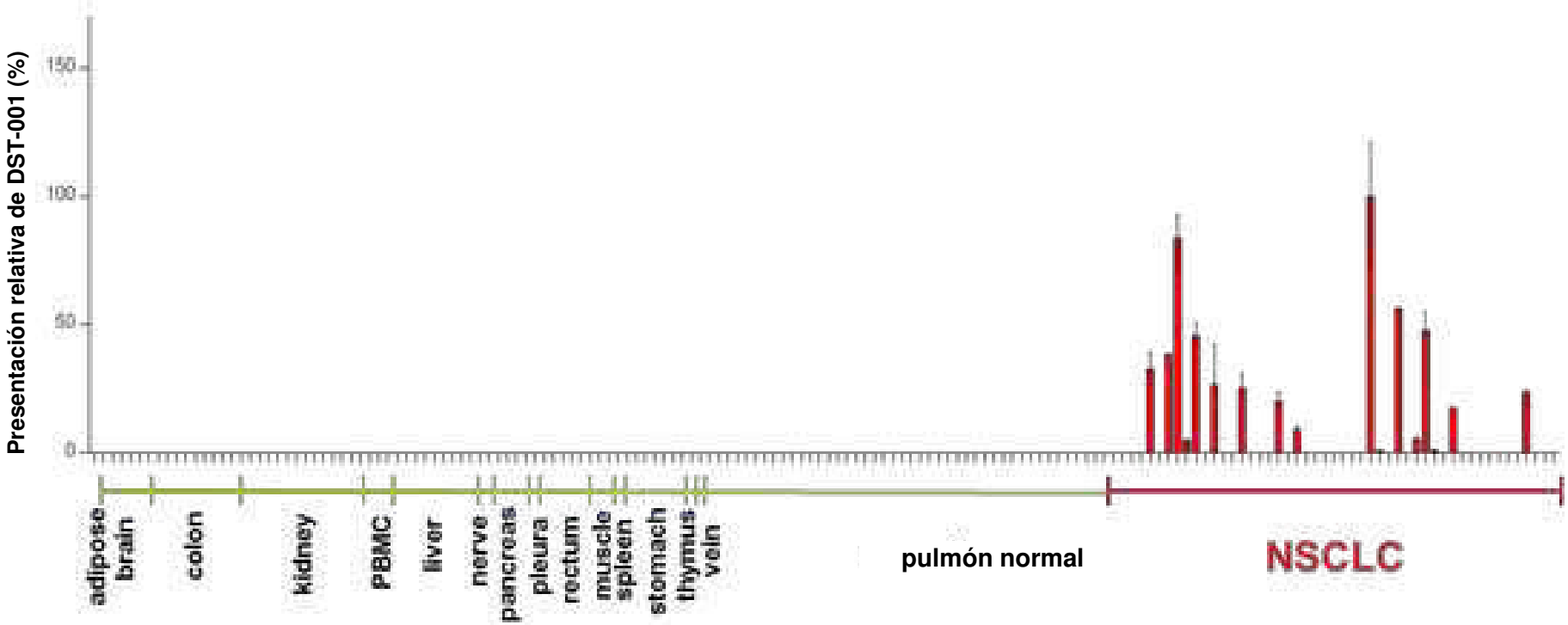

Expresión relativa de MMP12
500
400
300
200
100
0
glándula suprarrenal
arteria
médula ósea
cerebro completo
mama
colon
esófago
corazón
riñón
leucocitos
hígado
pulmón
ganglio linfático
ovario
páncreas
placenta
próstata
glándula salival
músculo esquelético
piel
intestino delgado
bazo
estómago
testículo
timo
tiroides
tráquea
vejiga urinaria
cuello uterino
útero
vena
Tejidos sanos
NSCLC

Figura 3b:



Adipose = adiposo
Brain = cerebro
Colon = colon
Kidney = riñón
Liver = hígado
Nerve = nervio
Pancreas = páncreas
Pleura = pleura
Rectum = recto
Muscle = músculo
Spleen = bazo
Stomach = estómago
Thymus = timo
Vein = vena

Figura 4:

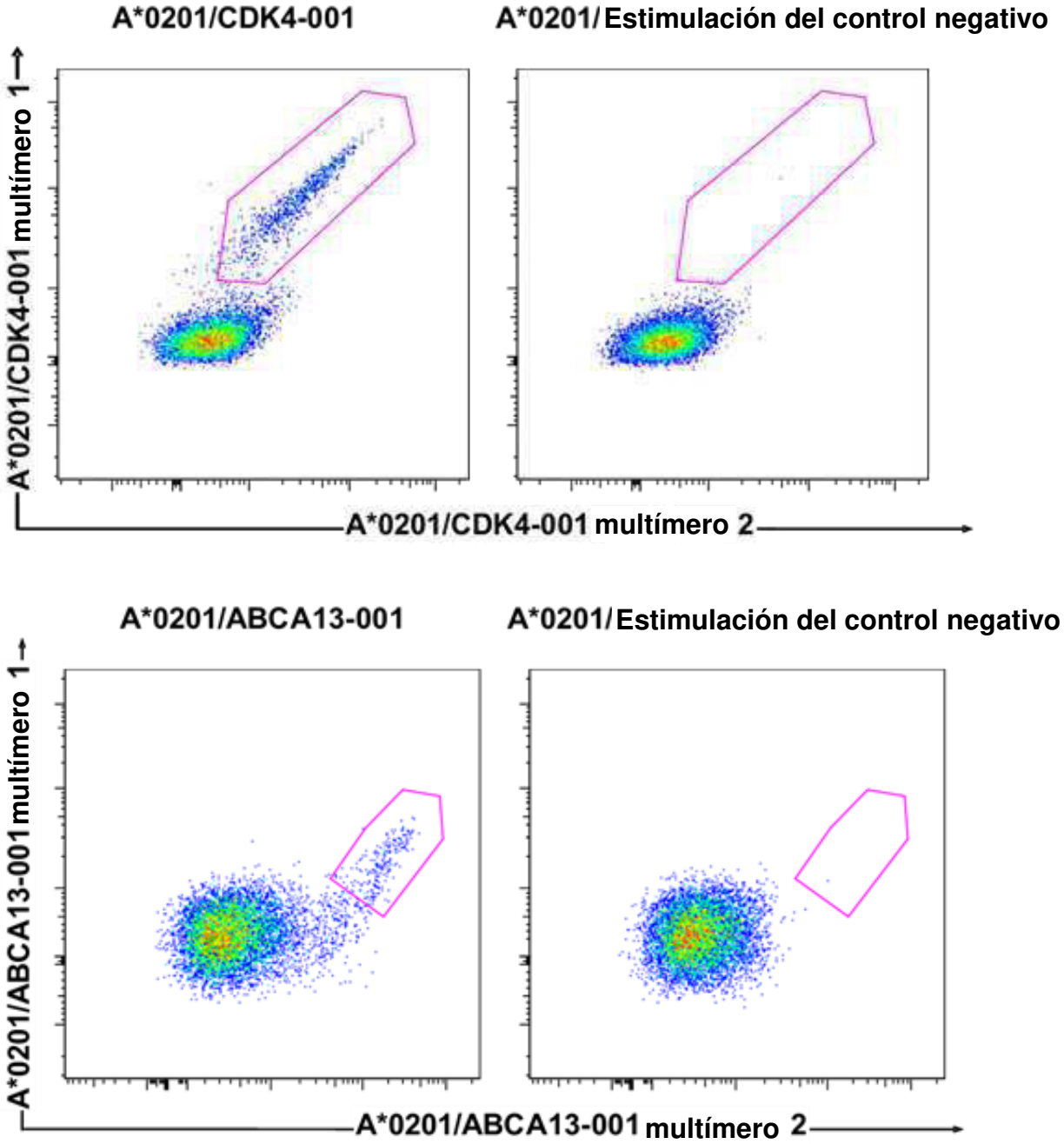

A*0201/CDK4-001
A*0201/ Estimulación del control negativo
A*0201/CDK4-001 multímero 1
A*0201/CDK4-001 multímero 2
A*0201/ABCA13-001
A*0201/ Estimulación del control negativo
A*0201/ABCA13-001 multímero 1
A*0201/ABCA13-001 multímero 2

Figura 5

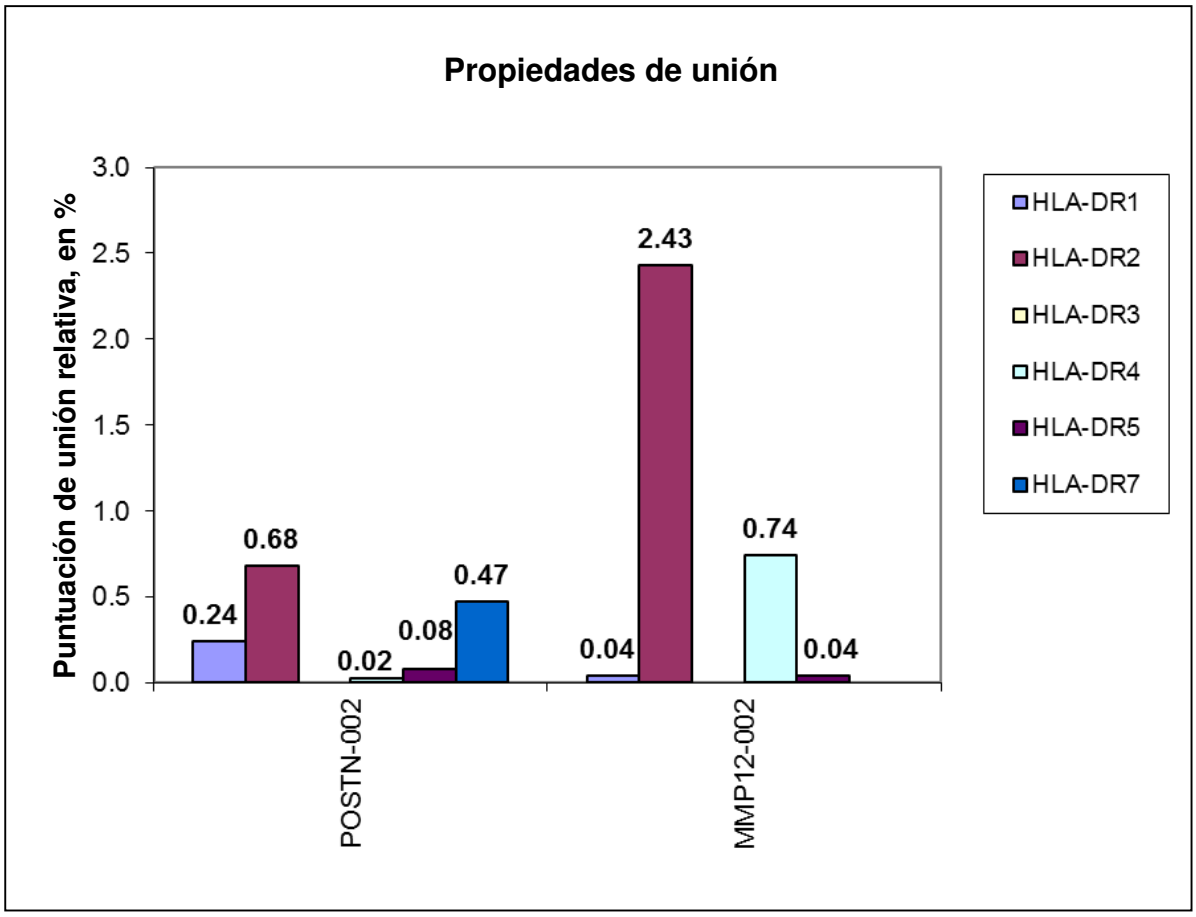

Propiedades de unión
Puntuación de unión relativa, en %
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.24
0.68
0.02
0.08
0.47
0.04
2.43
0.74
0.04
POSTN-002
MMP12-002
HLA-DR1
HLA-DR2
HLA-DR3
HLA-DR4
HLA-DR5
HLA-DR7

Figura 6

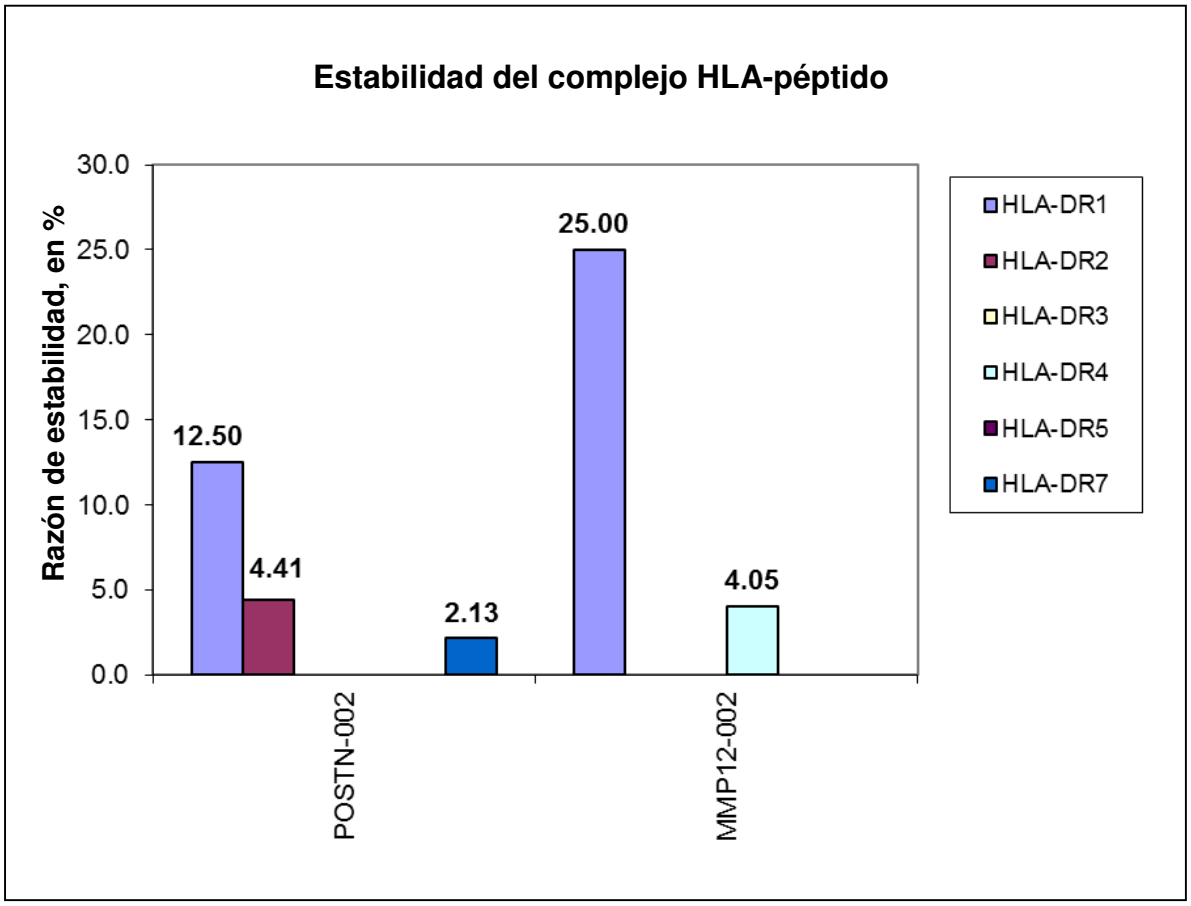

Estabilidad del complejo HLA-péptido
Razón de estabilidad, en %
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
12.50
4.41
2.13
25.00
4.05
POSTN-002
MMP12-002
HLA-DR1
HLA-DR2
HLA-DR3
HLA-DR4
HLA-DR5
HLA-DR7

Figura 7

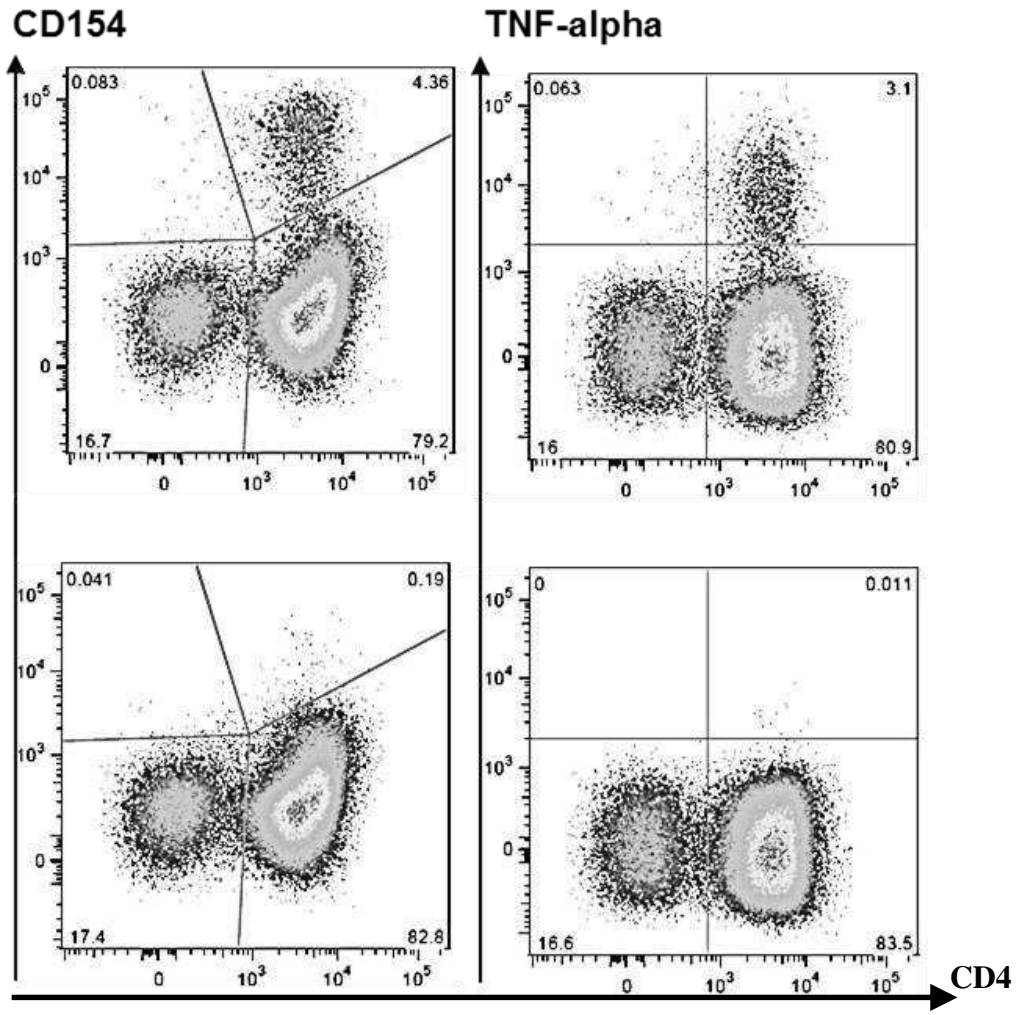

CD154
TNF-alpha
0.083
4.36
16.7
79.2
0.063
3.1
16
80.9
0.041
0.19
17.4
82.8
0
0.011
16.6
83.5
CD4

Figura 7 (continuación)

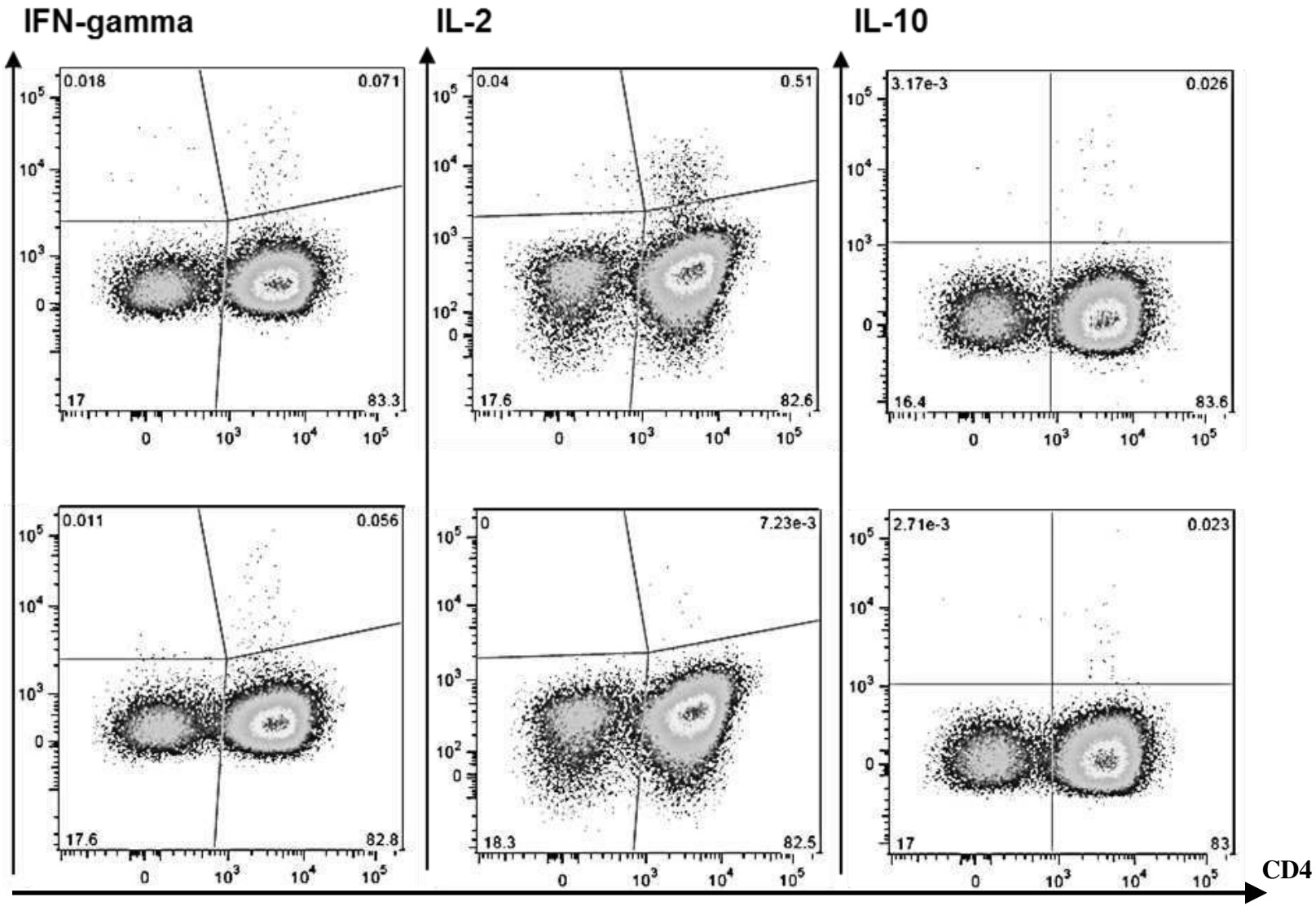
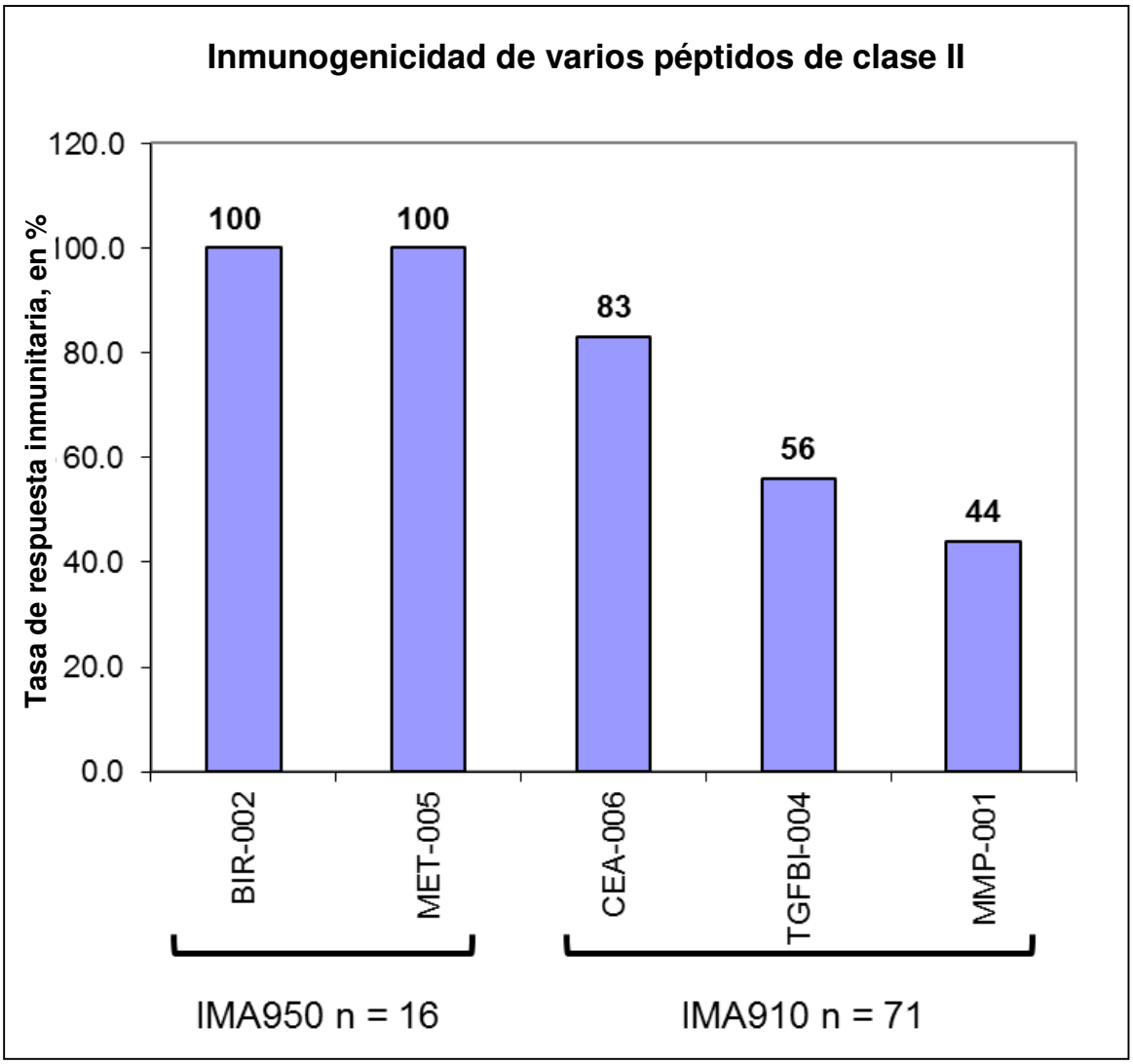


Figura 8


Inmunogenicidad de varios péptidos de clase II
Tasa de respuesta inmunitaria, en %
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
100
100
83
56
44
BIR-002
MET-005
CEA-006
TGFBI-004
MMP-001
IMA950 n = 16
IMA910 n = 71

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Nueva inmunoterapia contra diversos tumores como el cáncer de pulmón, incluido el carcinoma de pulmón amicrocítico (NSCLC)

<130> I32387WO-C

<150> GB1313987.8
<151> 2013-08-05

<150> US61/862,213
<151> 2013-08-05

<150> GB1403297.3
<151> 2014-02-25

<160> 90

<170> PatentIn version 3.5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Ile Gln Glu Met Gln His Phe Leu
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Leu Asp Glu Asn Leu His Gln Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Leu Ile Glu Lys Ser Ile Tyr Leu

1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Lys Leu Asp Glu Thr Asn Asn Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Val
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Met Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu
1 5

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Leu Met Asp Lys Glu Gly Leu Thr Ala Leu
1 5 10

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

<400> 10

Val Leu Ser Val Val Glu Val Thr Leu
1 5

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Leu Leu Pro Val Glu Val Ala Thr His Tyr Leu
1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu
1 5

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

<400> 13

Tyr Leu Ile His Phe Pro Val Ser Val
1 5

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

<400> 14

Phe Gln Tyr Asp His Glu Ala Phe Leu
1 5

<210> 15
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala
1 5

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Thr Val Ile Gly Phe Leu Leu Pro Phe Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

<400> 18

Thr Leu Tyr Pro His Thr Ser Gln Val
1 5

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

<400> 19

Ala Val Val Glu Phe Leu Thr Ser Val
1 5

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

<400> 20

Ala Leu Val Asp His Thr Pro Tyr Leu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Ile Leu Asp Thr Leu Tyr Glu Val
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Phe Leu Ile Pro Ile Tyr His Gln Val
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Phe Leu His His Leu Glu Ile Glu Leu
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val
1 5

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Gly Leu Tyr Pro Asp Ala Phe Ala Pro Val
1 5 10

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

<400> 26

Lys Leu Phe Gly Glu Lys Thr Tyr Leu
1 5

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

<400> 27

Thr Val Ala Glu Val Ile Gln Ser Val
1 5

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

<400> 28

Ser Ile Ser Asp Val Ile Ala Gln Val
1 5

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Leu Glu Glu Asp Asp Gly Asp Val Ala Met
1 5 10

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

<400> 30

Lys Ile Tyr Asn Glu Phe Ile Ser Val
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Ala Ile Asp Gly Asn Asn His Glu Val
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ile Tyr Leu
1 5

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

<400> 33

Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val
1 5

<210> 34

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

<400> 34

Ala Leu Gly Ala Gly Ile Glu Arg Met
1 5

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

<400> 35

Val Leu Phe Pro Asn Leu Lys Thr Val
1 5

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

<400> 36

Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val
1 5

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

<400> 37

Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu
1 5

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

<400> 38

Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu
1 5

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

<400> 40

Gly Leu Thr Asp Asn Ile His Leu Val
1 5

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Ser Leu Trp Gly Gly Asp Val Val Leu
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

<400> 44

Asn Leu Leu Ala Glu Ile His Gly Val
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Ile Met Gly Phe Ile Gly Phe Phe Val
1 5 10

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

<400> 46

Thr Leu Thr Asn Ile Ile His Asn Leu
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Val Leu Glu Asn Ile Phe Gly Val
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Leu Ile Glu Ile Ile Ser Asn Ala
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Leu Leu Ala Ala Glu Asn Phe Leu
1 5

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Leu Leu Pro Val Asp Ile Arg Gln Tyr Leu
1 5 10

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Tyr Leu Ala Pro Phe Leu Arg Asn Val
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Ser Leu
1 5

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

<400> 53

Tyr Leu Pro His Ala Pro Pro Phe Ala
1 5

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

<400> 54

Lys Leu Val Glu Phe Asp Phe Leu Gly Ala
1 5 10

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

<400> 55

Ser Leu Ala Asp Phe Met Gln Glu Val
1 5

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

<400> 56

Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val
1 5

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Gly Leu Ala Glu Asp Ile Asp Lys Gly Glu Val

1 5 10

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Ser Leu Ile Asp Ala Asp Pro Tyr Leu
1 5

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

<400> 59

Ile Leu Val Ser Trp Leu Pro Arg Leu
1 5

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

<400> 60

Val Val Asp Lys Thr Leu Leu Leu Val
1 5

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

<400> 61

Thr Leu Ile Ser Arg Leu Pro Ala Val
1 5

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Ile Leu Phe Pro Asp Ile Ile Ala Arg Ala
1 5 10

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

<400> 63

Ser Leu Ala Gly Asp Val Ala Leu Gln Gln Leu
1 5 10

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Ala Met Leu Ala Val Leu His Thr Val
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Lys Val Leu Glu Ile Leu His Arg Val
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 67
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ile Leu Gln Asp Arg Leu Asn Gln Val
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu
1 5

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

<400> 69

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val
1 5

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

<400> 70

Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val
1 5

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

<400> 71

Lys Leu Leu Glu Tyr Ile Glu Glu Ile
1 5

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

<400> 72

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
1 5

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

<400> 73

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu
1 5 10

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

<400> 75

Ala Leu Tyr Asp Ser Val Ile Leu Leu
1 5

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Ile Asn Asn Tyr Thr Pro Asp Met Asn Arg Glu Asp Val Asp Tyr Ala
1 5 10 15

Ile Arg

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Asn Gly Val Ile His Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp
1 5 10 15

Thr

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Ser Leu Tyr Asp Asn Gln Ile Thr Thr Val
1 5 10

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Leu Ala Pro Ala Gly Val Ile Arg Val
1 5 10

<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

Ser Leu Phe Gly Asn Ser Gly Ile Leu Glu Asn Val

1 5 10

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ala Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Val Val
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Ala Leu Trp Glu Lys Asn Thr His Leu
1 5

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Ala Leu Ala Asn Gln Lys Leu Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

Ile Leu Met Gly Thr Glu Leu Thr Gln Val
1 5 10

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

<400> 85

Lys Ile Val Asp Phe Ser Tyr Ser Val
1 5

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Ala Met Ala Thr Glu Ser Ile Leu His Phe Ala
1 5 10

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Arg Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Gln Ser Val
1 5 10

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu
1 5 10

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

<400> 89

Ala Leu Ala Ser Val Ile Lys Glu Leu
1 5

<210> 90
<211> 10

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

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

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

<400> 91

Ala Met Phe Glu Asn Phe Val Ser Val
1 5

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

<400> 92

His Leu Leu Glu Asp Ile Ala His Val
1 5