Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RAD: 19-102919- -1 **FECHA**: 2019-05-06 19:06:50
DEP: 10 OFICINAJURIDICA **EVE:** 0 SINEVENTO
TRA: 334 REMISIINFORMA **FOLIOS**: 1
ACT: 440 RESPUESTA

Bogotá D.C.

10

Doctor
ALONSO CASTRILLON FORERO
notificaciones@clarkemodet.com.co

Asunto: Radicación: 19-102919- -1
Trámite: 334
Evento: 0
Actuación: 440
Folios: 1

Estimado(a) Doctor:

De conformidad con lo previsto en el artículo 28 de la Ley 1755 de 2015, "*por medio de la cual se regula el Derecho Fundamental de Petición y se sustituye un título del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo",* fundamento jurídico sobre el cual se funda la consulta objeto de la solicitud, procede la **SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO** a emitir un pronunciamiento, en los términos que a continuación se pasan a exponer:

1. OBJETO DE LA CONSULTA

En relación con su solicitud de 19 de marzo de 2019, radicada bajo el número de la referencia, donde nos solicita precisión respecto a la presentación de solicitudes divisionales y la aplicación de las disposiciones contenidas en la Resolución No. 3719 del 2 de febrero de 2016, el Artículo 36 de la Decisión 486 y la Circular Única, nos permitimos dar respuesta a continuación de cada una de sus inquietudes:

2. CUESTIÓN PREVIA

Reviste de gran importancia precisar en primer lugar que la **SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO** a través de su Oficina Asesora Jurídica no le asiste la

facultad de dirimir situaciones de carácter particular, debido a que, una lectura en tal sentido, implicaría la flagrante vulneración del debido proceso como garantía constitucional.

Al respecto, la Corte Constitucional ha establecido en la Sentencia C-542 de 2005:

> *"Los conceptos emitidos por las entidades en respuesta a un derecho de petición de consulta no constituyen interpretaciones autorizadas de la ley o de un acto administrativo. No pueden reemplazar un acto administrativo. Dada la naturaleza misma de los conceptos, ellos se equiparan a opiniones, a consejos, a pautas de acción, a puntos de vista, a recomendaciones que emite la administración pero que dejan al administrado en libertad para seguirlos o no".*

A continuación proporcionamos información general que consideramos pertinente en relación con el tema de su escrito, con el fin de ilustrarlo sobre nuestras funciones, esperando que esta información le sea de ayuda en la toma de una decisión.

3. FACULTADES DE LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO EN MATERIA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

De acuerdo a lo establecido en el numeral 57, artículo 1, del Decreto 4886 de 2011, la Superintendencia de Industria y Comercio tiene a su cabeza la función de *"Administrar el sistema nacional de la propiedad industrial y tramitar y decidir los asuntos relacionados con la misma"*.

Teniendo como base la función mencionada, en el artículo 19 de dicho Decreto se establecen las funciones de la Dirección de Nuevas Creaciones, de la cual podemos destacar para el presente caso:

> *"1. Tramitar las solicitudes de patentes de invención.*
>
> *2. Tramitar las solicitudes de licencias obligatorias de patentes de invención.*
>
> *3. Adelantar los trámites de caducidades de patentes de invención.*
>
> *4. Decidir las solicitudes de inscripción de las actuaciones posteriores a la concesión de los derechos sobre nuevas creaciones, salvo aquellas atribuidas al Superintendente de Industria y Comercio.*

5. Decidir las solicitudes relacionadas con patentes de modelos de utilidad, así como con las demás actuaciones posteriores a la concesión del derecho.

6. Decretar la caducidad de las patentes de modelos de utilidad.

7. Decidir las solicitudes de esquema de trazado de circuitos integrados.

8. Decidir las solicitudes que se relacionen con el registro de diseños industriales y las demás actuaciones posteriores a la concesión del registro.

9. Llevar los archivos y registros de las patentes de invención, de los modelos de utilidad, del registro de diseños industriales y de los esquemas de trazados de circuitos integrados.

(…)"

De acuerdo con dichas normas esta Superintendencia cuenta, entre otras, con las siguientes atribuciones:

• Administra el registro nacional de la propiedad industrial, instrumento en el que se inscriben todos los actos de concesión de derechos de propiedad industrial a través de registro o patente, los actos por los cuales se modifican y transfieren y los que establecen presunción de primer uso o conocimiento del mismo (depósitos).

• Tramitar y decidir las solicitudes de concesión de patentes de invención y de modelo de utilidad, registros de diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados, marcas y lemas, depósitos de nombres y enseñas comerciales, declaración y autorizaciones de uso de denominaciones de origen.

Por otra parte, el literal a) del numeral 3 del artículo 24 del Código General del Proceso -Ley 1564 de 2012- otorgó facultades jurisdiccionales a la Superintendencia de Industria y Comercio para conocer de litigios por infracción a los derechos de propiedad industrial.

Ahora bien, una vez realizadas las anteriores precisiones, se suministrarán las herramientas de información y elementos conceptuales necesarios que le permitan absolver las inquietudes por usted manifestadas, como sigue:

4. NORMATIVIDAD VIGENTE

El artículo 36 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina señala: *"El solicitante podrá, en cualquier momento del trámite, dividir su solicitud en dos o más fraccionarias, pero ninguna de éstas podrá implicar una ampliación de la protección que corresponda a la divulgación contenida en la solicitud inicial".*

Para tal efecto, la Resolución No. 3719 del 2 de febrero de 2016 establece un conjunto de instrucciones que rigen algunas actuaciones de la Decisión 486, entre ellas, el procedimiento que deberá ser tenido para surtir el trámite de división de una solicitud de patente de invención o de una solicitud de patente de modelo de utilidad.

Específicamente, la Resolución No. 3719 del 2 de febrero de 2016 menciona en su numeral 1.2.2.3.2.1, relativo al "Contenido de la solicitud fraccionaria" que *"En los casos en que la solicitud divisional se realice **a instancias del solicitante**, la división deberá hacerse de **forma literal**, teniendo en cuenta la numeración de las reivindicaciones de forma consecutiva, **sin perjuicio de las posteriores modificaciones** que sobre dichas reivindicaciones contenidas en la solicitud fraccionaria pueda realizar el solicitante, previo pago de la tasa establecida para tal efecto. De igual manera, la memoria descriptiva deberá estar acorde con la división de la materia realizada.*

En el evento en que la solicitud divisional no se realice con el lleno de los requisitos exigidos en esta norma, se expedirá un requerimiento de conformidad con el artículo 17 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo -Ley 1437 del 2011-, para que el solicitante cumpla dichos requisitos y, en caso de no hacerlo, se archivará la solicitud.

Las modificaciones hechas a la solicitud inicial no afectarán la posibilidad de que ésta siga siendo entendida como inicial para propósitos de la solicitud divisional." (Énfasis fuera del texto original)

Complementando la información anterior, el numeral 1.2.2.3.2.1, que se refiere al "Procedimiento" de las solicitudes divisionales, establece *"La presentación de una solicitud divisional no alterará el curso del trámite de la solicitud inicial que contiene el primer grupo inventivo. Las solicitudes fraccionarias integradas por los demás grupos inventivos seguirán su propio trámite en el estado en el que se encontraban, **previo***

pago de las tasas de presentación y examen de patentabilidad *establecidas en la resolución de tasas vigente en el momento de la solicitud de división, y a las mismas se les realizará el examen de patentabilidad y/o se expedirá la decisión correspondiente a la etapa procedimental respectiva."* (Énfasis fuera del texto original)

4.1. Sobre los interrogantes

4.1.1. ¿Es posible, al momento de la presentación de la solicitud divisional, modificar las reivindicaciones que constituyen la división literal pagando la tasa respectiva?

No. Como se indica en el numeral 1.2.2.3.2.1, si el solicitante desea presentar una solicitud divisional la división deberá hacerse de forma literal, esto es, de forma textual y teniendo en cuenta la numeración de las reivindicaciones de forma consecutiva. Una vez la solicitud divisional haya sido aceptada a trámite, es decir, que la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) haya verificado que la división fue efectuada de forma literal, y tal aceptación se refleje en el sistema (SIPI), el solicitante podrá efectuar las modificaciones que sean de su interés.

4.1.2. ¿A qué se hace referencia con división literal?

Una división literal es aquella en la cual una o más reivindicaciones del capítulo reivindicatorio de la solicitud inicial son eliminadas para incluirla(s) **de forma textual y** teniendo en cuenta la numeración de las reivindicaciones de **forma consecutiva**, en el capítulo reivindicatorio de una solicitud fraccionaria.

4.1.3. ¿Hasta qué momento es posible presentar una solicitud divisional? En caso de otorgarse una patente y si el solicitante tiene interés en proteger otros grupos inventivos, ¿hasta qué momento es posible presentar una solicitud divisional?

De acuerdo con el artículo 36 de la Decisión 486, una solicitud divisional puede ser presentada en cualquier momento del trámite hasta que la SIC adopte la decisión final, es decir, hasta antes de la decisión de concesión o de ser el caso, hasta antes de que se emita la resolución que decide el recurso de reposición.

Siendo así, si el solicitante está interesado en proteger otros grupos inventivos, deberá presentar una o más solicitudes fraccionarias respecto a la solicitud inicial, las que él desee**,** en un momento **previo a la adopción de la decisión final de dicha solicitud inicial** por parte de la SIC. Lo anterior, teniendo en cuenta que el numeral 1.2.2.3.2 menciona que *"Cuando la solicitud divisional sea presentada por iniciativa del solicitante, solamente podrá hacerlo respecto de una solicitud inicial, sin perjuicio del*

número de solicitudes fraccionarias que de la misma solicitud inicial se deriven, las cuales se tramitarán como solicitudes independientes."

4.1.4. ¿Cómo debe realizarse la división literal, si la reivindicación independiente inicial cubre varias modalidades (incluyendo la de la solicitud en trámite y la que se desea proteger) sin generar solapamiento? Esto es particularmente relevante para las invenciones en las que se busca proteger una fórmula Markush o un grupo de secuencias en las que la reivindicación independiente tiene el mayor alcance.

En principio, si la reivindicación independiente inicial cubre varias modalidades, el solicitante debe presentar una modificación del capítulo reivindicatorio de dicha solicitud inicial, para que éste contenga una reivindicación independiente por cada concepto inventivo que desea proteger. Una vez efectuada tal enmienda, el solicitante podrá proceder a la división literal de la solicitud, teniendo en cuenta la numeración de las reivindicaciones de forma consecutiva.

Para ilustrar el caso, si la reivindicación 1 se refiere a una fórmula Markush donde el radical Z puede ser un radical seleccionado del grupo que comprende metilo y fenilo, el solicitante deberá modificar la solicitud para que comprenda dos reivindicaciones independientes, una primera reivindicación independiente que reclama la fórmula Markush donde el radical Z es metilo y una segunda reivindicación independiente que cubre los compuesto que tienen la fórmula Markush donde el radical Z es fenilo. Luego de efectuado este cambio, el solicitante podrá solicitar una divisional, donde la solicitud inicial comprenda de forma textual la primera reivindicación independiente y sus dependientes y la solicitud fraccionaria comprenda de forma textual la segunda reivindicación independiente y las reivindicaciones que dependan de esta última. De esta forma, para la SIC será claro que la materia reivindicada en la divisional no se superpone.

4.1.5. En relación con el punto anterior y teniendo en cuenta el requisito de división literal cuando la solicitud se realiza a instancias del solicitante, ¿Cómo se realiza la división literal cuando se desea proteger una modalidad que sólo está en la Descripción y que no fue contenida en las reivindicaciones iniciales o en las modificadas durante el trámite?

En este caso, el solicitante debe presentar una modificación del capítulo reivindicatorio de la solicitud inicial para incluir una reivindicación independiente con la información de la descripción que no está contenida en el capítulo reivindicatorio inicial. Una vez efectuada tal enmienda, el solicitante podrá proceder a la división literal de la solicitud, teniendo en cuenta la numeración de las reivindicaciones de forma consecutiva.

4.1.6. ¿Qué sucede con la solicitud divisional, si en opinión del examinador la respuesta del solicitante al requerimiento realizado bajo el Artículo 17 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo (Ley 1437 de 2011) no subsana todas las objeciones?

Como se indica en el numeral 1.2.2.3.2.1 de la Resolución No. 3719 del 2 de febrero de 2016, en el evento en que la solicitud divisional no cumpla con los requisitos exigidos en la Decisión 486 y en la citada Resolución, se procederá a declarar el desistimiento de la solicitud divisional y el archivo de esta.

4.1.7. ¿A qué se hace referencia con "*la memoria descriptiva deberá estar acorde con la división de la materia realizada*" según lo indicado en el numeral 1.2.2.3.2.1 de la Resolución 3719? Se ha observado negaciones de solicitudes divisionales en las que según el Examinador no existió una división acorde. ¿En qué parte de la legislación se define la expresión "división acorde"? y, ¿Cuál es el criterio que deben aplicar los examinadores para hacer esta evaluación?

La frase *"la memoria descriptiva deberá estar acorde con la división de la materia realizada"* se refiere al cumplimiento de las disposiciones del artículo 28 de la Decisión 486, que establece que *"La descripción deberá divulgar la invención de manera suficientemente clara y completa para su comprensión y para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla."* y del artículo 30 de la misma Decisión, que *"Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción."*

Siendo así, la frase en cuestión señala que la descripción que se aporte en la solicitud fraccionaria deberá sustentar completamente la materia reclamada y divulgar la invención de manera suficiente y clara para la compresión de las reivindicaciones incluidas en la solicitud divisional y permitir su ejecución por parte de una persona versada en la materia.

4.1.8. ¿Una solicitud divisional puede contener materia ya evaluada por un Examinador durante la etapa de fondo, pero que fue eliminada por propósitos de claridad o unidad de invención?

Si. Una solicitud divisional puede contener cualquier materia que no amplíe la protección que corresponde a la divulgación contenida en la solicitud inicial y que no esté cubierta dentro del alcance de la protección de las reivindicaciones incluidas en la solicitud parental.

4.1.9. ¿Por qué se exige restringir el contenido de la memoria descriptiva de una solicitud divisional si se entiende que ésta puede hacer referencia a un contenido mayor, toda vez que debe ofrecer soporte para la invención?

El interrogante planteado es una interpretación errada de la norma, puesto que ella no exige que se restrinja el contenido de la memoria descriptiva de las solicitudes divisionales, lo que dicho numeral requiere es que la descripción sea "acorde" con la división realizada. Como se mencionó en la respuesta a la pregunta 2.7, el numeral 1.2.2.3.2.1 de la Resolución 3719 señala, como se establece en los artículo 28 y 30, que la descripción de las solicitudes divisionales tienen que tener la información suficiente para soportar la materia reclamada en las reivindicaciones de la o las solicitud(es) fraccionaria(s) y debe divulgar la invención reclamada en la(s) solicitud(es) divisional(es) de manera suficiente y clara para que una persona versada en la materia pueda reproducirla.

4.1.10. La Resolución No. 46528 del 2017, en el numeral 1.2.2.8. dice: *"Siempre que el solicitante realice una modificación al capítulo reivindicatorio o descriptivo y que la misma no se realice en respuesta a los requerimientos de los que tratan los artículos 39 o 45 de la Decisión 486 de 2000, deberá pagar la tasa de modificación correspondiente establecida en la resolución de tasas que se encuentre vigente"*

***Dicha tasa deberá ser pagada por el solicitante así también se realiza una modificación al capítulo reivindicatorio o descriptivo con la presentación de un recurso."* (Subrayado por fuera del texto)**

Según lo indicado en el numeral 1.2.2.8 de la Resolución No. 46528 del 2017 ¿Debemos entender que la resolución permite y acepta realizar con la presentación del recurso de reposición cualquier tipo de modificaciones, incluyendo aquellas que puedan considerarse como sustanciales y que por ende, deben ser estudiadas por el Despacho? De no ser así, explique cuál es el fundamento legal para no aceptarse las modificaciones sustanciales y/o el fundamento legal para que se rechace el estudio de las modificaciones presentadas con un recurso.

En relación con la modificación de una solicitud de patente, el artículo 34 de la Decisión 486 es claro en establecer que "*El solicitante de una patente podrá pedir que se modifique la solicitud en cualquier momento del trámite. La modificación no podrá implicar una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.*"

A la luz del citado artículo, las modificaciones se pueden presentar en cualquier momento del trámite, incluso hasta antes de la concesión o de que se emita la resolución que decide el recurso de reposición, y dichas modificaciones pueden incluir cambios sustanciales siempre y cuando los mismos no impliquen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

En la Oficina Asesora Jurídica de la Superintendencia de Industria y Comercio estamos comprometidos con nuestros usuarios para hacer de la atención una experiencia de calidad. Por tal razón le invitamos a evaluar nuestra gestión a través del siguiente link http://www.encuestar.com.co/index.php/2100?lang=esQ%

En ese orden de ideas, esperamos haber atendido satisfactoriamente su consulta, reiterándole que la misma se expone bajo los parámetros del artículo 28 de la Ley 1755 de 2015, esto es, bajo el entendido que las mismas no comprometen la responsabilidad de esta Superintendencia ni son de obligatorio cumplimiento ni ejecución.

Atentamente,

JAZMÍN ROCÍO SOACHA PEDRAZA
JEFE OFICINA ASESORA JURÍDICA

Elaboró: Adriana Velandia
Revisó: Rocío Soacha Pedraza
Aprobó: Rocío Soacha Pedraza

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

P-20935

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

Re: Expediente N.º **NC2019/0005203**
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 N.º 86-53, obrando como apoderada de la sociedad **IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH**, domiciliada en Tübingen, Alemania, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al Oficio N.º **4942** notificado mediante notificación electrónica el 20 de junio de 2019, relacionado con el Artículo 17 del Código de Procedimiento Administrativo y Contencioso Administrativo, mediante el cual su despacho requiere al solicitante **completar la solicitud de divisional**, atentamente me permito manifestar que:

1. Caso particular

Su despacho indica que la Descripción de la presente solicitud divisional, es idéntica a la Descripción de la solicitud parental NC2017/0003772; y a su vez, la Descripción de esta solicitud divisional es idéntica a las Descripciones de las otras solicitudes divisionales NC2019/0005200 y NC2019/0005202, porque considera que tanto el objeto reclamado en la solicitud parental NC2017/0003772 (Un péptido recombinante o sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 53, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo), como el objeto reclamado en la presente solicitud divisional NC2019/0005203 (Un péptido recombinante o sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 255, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo), difieren del objeto reclamado en las solicitudes divisionales NC2019/0005200 (Un péptido recombinante o sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y NC2019/0005202 (Un péptido recombinante o sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 47, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) respectivamente.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

En consecuencia, su Despacho sugiere omitir de la Descripción todas las referencias anteriormente mencionadas que no corresponden al objeto de la presente solicitud divisional, donde en la Descripción no debe existir las referencias a los péptidos que se reclaman tanto en la solicitud parental NC2017/0003772, como en las solicitudes divisionales NC2019/0005200 y NC2019/0005202.

En respuesta al requerimiento, junto con el presente escrito se presenta una descripción modificada, la cual ha sido ajustada para hacer claridad en que la invención hace referencia a la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID N.º 255**.

Para su mejor referencia, a continuación se detalla la ubicación de los secciones modificadas:

1.1 En la página 4, líneas 3 a 21.
1.2 En la página 14, líneas 7 a 11.
1.3 En la página 36, líneas 1 a 15, y líneas 27 a 29.
1.4 En la página 38, líneas 24 27.
1.5 De la línea 28 en la página 83 a la línea 2 en la página 84.
1.6 En la página 85, líneas 18 a 21.
1.7 En la página 88, líneas 12 a 13.
1.8 En la página 102, líneas 12 a 17.
1.9 En la página 108, líneas 9 a 19 y líneas 25 a 27.
1.10 En la página 110, líneas 6 a 9.
1.11 En la página 111, líneas 22 a 28.
1.12 En la página 120, líneas 14 a 17.
1.13 En la página 121, líneas 12 a 17
1.14 En la página 122, líneas 3 a 6 y líneas 20 a 31.
1.15 En la página 123, líneas 15 a 22.
1.16 En la página 136, líneas 7 a 10.
1.17 En la página 137, líneas 21 a 23.
1.18 En la página 140, líneas 5 a 19.
1.19 En la página 153, líneas 24 a 27.
1.20 De la línea 30 en la página 157 a la línea 2 en la página 158.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Se hace notar que la descripción hace énfasis en que la presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID N.º 255**, y aclara que los ejemplos también se refirieren a las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 254, y de la SEQ ID N.º 256 a la SEQ ID N.º 300 **como ejemplos de referencia**, teniendo en cuenta que dicha información le facilitaría a la persona del oficio normalmente versada en la materia el entendimiento de la invención y su realización.

Por otra parte, con respecto al requisito para las solicitudes de división establecido en el numeral 1.2.2.3.2.1 del Título X de la Circular, según el cual *"La memoria descriptiva este acorde con la división de la materia realizada"*, es importante resaltar que su despacho precisó en el numeral 4.1.7 del radicado N.º **19-102919- -1** del 6 de mayo de 2019, que:

> *"La frase "la memoria descriptiva deberá estar acorde con la división de la materia realizada" se refiere al cumplimiento de las disposiciones del artículo 28 de la Decisión 486, que establece que "La descripción deberá divulgar la invención de manera suficientemente clara y completa para su comprensión y para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla." y del artículo 30 de la misma Decisión, que "Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.*
>
> *Siendo así, la frase en cuestión señala que la descripción que se aporte en la solicitud fraccionaria deberá sustentar completamente la materia reclamada y divulgar la invención de manera suficiente y clara para la compresión de las reivindicaciones incluidas en la solicitud divisional y permitir su ejecución por parte de una persona versada en la materia."*

Para su mejor referencia se anexa copia del del radicado N.º 19-102919- -1 al presento memorial.

Así, en vista y los argumentos aquí presentados, es posible manifestar que la descripción de la presente solicitud divisional se encuentra acorde con la división de la materia realizada por el solicitante, ya sustenta completamente la materia reclamada y divulga la invención de manera suficiente y clara para la compresión de las

Clarke Modet +

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

reivindicaciones incluidas en la solicitud divisional y permitir su ejecución por parte de una persona versada en la materia.

2. Conclusiones

Considerando los argumentos indicados anteriormente y las modificaciones realizadas a la descripción de la solicitud, es claro que la solicitud de división tal como ha sido modificada en esta oportunidad cumple con los requisitos estipulados en la Circular Única para solicitudes divisionales, puesto que (i) No amplia la protección que corresponde a la materia inicialmente solicitada en la solicitud original del radicado N.º NC2017/0003772, (ii) La división fue realizada de la manera señalada por la Dirección de Nuevas Creaciones, (iii) La memoria descriptiva está acorde con la división de la materia realizada, (iv) El formulario de solicitud de divisional fue debidamente diligenciado y acompañado de los documentos que fueran necesarios para formar las solicitudes fraccionarias, y (v) Se realizó el pago de las tasas de presentación y examen de patentabilidad correspondientes.

Así, respetuosamente se solicita aceptar la división de la patente presentada bajo el radicado N.º NC2019/0005203, y por consiguiente examinar la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial para la invención titulada "*PÉPTIDOS Y COMBINACIÓN DE PÉPTIDOS PARA INMUNOTERAPIA CONTRA EL CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC) Y OTROS TIPOS DE CÁNCER*" a nombre de IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH y, por lo tanto, a la Superintendencia de Industria y Comercio conceder el privilegio de patente, si los cumpliese; o si el señor examinador considera que subsisten razones para no aceptar la solicitud divisional, rogamos **comunicarnos** los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad completar la solicitud con base en la interpretación del 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: *"Habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el peticionario y por los terceros reconocidos",* (el subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a su despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

3. Anexos

3.1 Descripción de la solicitud divisional que contiene **209** páginas.

3.2 Radicado 19-102919- -1 del 6 de mayo de 2019

Señor Director,



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

I32728WO-C

Péptidos y combinación de péptidos para inmunoterapia contra el carcinoma hepatocelular (CHC) y otros tipos de cáncer

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

Antecedentes de la invención

El carcinoma hepatocelular (CHC) es uno de los tumores más frecuentes en el mundo y a escala mundial representa en torno al 6% de los nuevos casos de cáncer diagnosticados. En 2012 hubo alrededor de 782.000 casos nuevos de CHC en el mundo, lo que lo convierte en el quinto tipo de cáncer más frecuente en los varones (554.000 casos) y el noveno en las mujeres (228.000 casos) (http://globocan.iarc.fr). El CHC es la neoplasia maligna primaria de hígado más frecuente, pues supone más del 80% de los casos de cáncer hepático primario en adultos.

La distribución del CHC muestra una variación geográfica y las tasas de incidencia dependen del sexo. La tasa de incidencia ajustada a la edad del CHC en varones es máxima en el este (31,9) y el sudeste de Asia (22,2), intermedia en el sur de Europa (9,5) y Norteamérica (9,3) y baja en el norte de Europa (4,6) y en el sur y centro de Asia (3,7). Las tasas de incidencia del CHC en las mujeres son inferiores a las de los hombres. La tasa de incidencia ajustada a la edad máxima en la población femenina se da en el este de Asia (10,2) y el oeste de África (8,1), y es mínima en el norte de Europa (1,9) y en la Micronesia (1,6).

El pronóstico general de los pacientes con CHC es poco halagüeño. La supervivencia relativa a 5 años ronda el 15%, según el estadio en que se encuentre en el momento del diagnóstico. En el CHC localizado, cuando el cáncer permanece aún confinado en el hígado, la supervivencia relativa a 5 años ronda el 28%. En lo que concierne al CHC regional y a distancia, cuando el cáncer se ha extendido a los órganos cercanos o distantes, es del 7% y del 2%.

La incidencia de la CHC está relacionada con diversos factores de riesgo, siendo la cirrosis el más importante. La cirrosis suele estar vinculada al alcoholismo o a la infección por los virus de la hepatitis B o C, pero también puede tener su causa en metabolopatías como la diabetes de tipo II. Como resultado, el tejido hepático sano es sustituido por tejido cicatricial, lo que aumenta el riesgo de aparición del cáncer.

El tratamiento de la enfermedad depende del estadio tumoral en el momento del diagnóstico y del estado general del hígado. Cuando es posible se extirpa una parte del órgano (hepatectomía parcial), o bien entero (hepatectomía total). Los pacientes aptos para recibir un transplante hepático son aquellos que presentan tumores pequeños o totalmente resecables.

Cuando la extirpación quirúrgica no es una opción viable, existen otros tratamientos disponibles. Para la ablación del tumor, se introduce una sonda en el hígado y el tumor se destruye con radiación, microondas o crioterapia. En los procedimientos de

embolización se interrumpe la irrigación sanguínea del tumor con medios mecánicos o químicos. Como radioterapia también se pueden usar ondas de radio de alta energía para destruir el tumor.

La quimioterapia contra el CHC incluye combinaciones de doxorrubicina, 5-fluorouracilo y cisplatino como tratamiento sistémico, y doxorrubicina, floxuridina y mitomicina C en infusiones en la arteria hepática. Pese a todo, la mayoría de los CHC muestran una elevada resistencia a los antineoplásicos (Enguita-German and Fortes, 2014).

Las opciones terapéuticas contra el CHC avanzado irresecable se limitan a Sorafenib, un inhibidor de la tirosina-cinasa ligada a múltiples receptores (Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Sorafenib es el único fármaco sistémico del que se ha confirmado que aumenta la supervivencia unos 3 meses y actualmente supone la única opción de tratamiento experimental para tales pacientes (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008).

Últimamente se ha efectuado un pequeño número de ensayos clínicos de inmunoterapia contra el CHC. En ellos se ha recurrido a citocinas para activar subtipos de células inmunitarias y/o potenciar la inmunogenicidad antitumoral (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Otros ensayos han optado por la infusión de linfocitos infiltrantes en el tumor o de linfocitos activados extraídos de la sangre periférica (Shi et al., 2004a; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

Hasta la fecha se ha ejecutado un contado número de ensayos de vacunación terapéutica. Butterfield et al. llevaron a cabo dos ensayos con péptidos derivados de la alfa-fetoproteína (AFP) como vacuna o con células dendríticas cargadas *ex vivo* con péptidos de dicha proteína (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). En otros dos estudios diferentes se sensibilizaron células dendríticas (CD) autólogas *ex vivo* con un lisado de tumor autólogo (Lee et al., 2005)o con un lisado de la estirpe celular de hepatoblastoma HepG2 (Palmer et al., 2009). Hasta el momento los ensayos de vacunación se han saldado con pequeñas mejoras en los resultados clínicos.

Resumen de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, ésta se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255 o a una secuencia variante del mismo que es homóloga al menos en 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 255, en el que dicha variante se une a MHC y/o estimula linfocitos T que presentan reactividad cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido el polipéptido entero del que derivaría.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de la presente invención que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º 255, o una variante del mismo, que es homóloga al menos en un 80%, preferiblemente en el 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 80% o al menos en un 88%) a la SEQ ID N.º 255, en la que dicho péptido o una variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente de entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

La presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255. Los ejemplos se refieren además a las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 254, y de la SEQ ID N.º 256 a la SEQ ID N.º 300 como ejemplos de referencia.

Las tablas siguientes muestran los péptidos conformes con la presente invención, sus respectivas SEQ ID N.º, y los probables genes originarios (subyacentes) de tales péptidos. Todos los péptidos de la Tabla 1 se unen a los alelos HLA-A*02, y los péptidos de la Tabla 2 se unen a los alelos HLA-A*24. Los péptidos de la Tabla 3 han sido dados a conocer con anterioridad en grandes listados resultantes del cribado genético ultrarrápido con elevadas tasas de error o son el resultado del cálculo con algoritmos, pero no han sido vinculados en absoluto con el cáncer hasta ahora. Se unen a alelos HLA-A*02. Los péptidos de la Tabla 4 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos de la invención. Los péptidos se unen a A*02 o, si

se indica, a A*24. Los péptidos de la Tabla 5 además son útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de otras neoplasias malignas que sobreexpresan o presentan en exceso el correspondiente polipéptido subyacente.

Tabla 1: Péptidos HLA-A*02 conforme a la presente invención - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
1	VMAPFTMTI	338	APOB
2	KLQAGTVFV	10840	ALDH1L1
3	ILDDNMQKL	79611	ACSS3
4	KLQDFSDQL	338	APOB
5	ALVEQGFTV	338	APOB
6	KLSPTVVGL	8313	AXIN2
7	ALVDTLKFV	338	APOB
8	KLLEEATISV	54808	DYM
9	ALANQKLYSV	23195	MDN1
10	SLLEEFDFHV	8615	USO1
11	SLSQELVGV	24149	ZNF318
12	FLAELAYDL	2719	GPC3
13	GLIDTETAMKAV	3290	HSD11B1
14	ALADLTGTVV	23385	NCSTN
15	LLYGHTVTV	347734	SLC35B2
16	SLLGGNIRL	2181	ACSL3
17	RVAS*PTSGV	8660	IRS2
18	ALYGKTEVV	57513	CASKIN2
19	FLEETKATV	338	APOB
20	KLSNVLQQV	338	APOB
21	QLIEVSSPITL	338	APOB
22	RIAGIRGIQGV	23167	EFR3A
23	RLYDPASGTISL	23456	ABCB10
24	SLAEEKLQASV	2194	FASN
25	SLDGKAALTEL	338	APOB
26	SLLHTIYEV	85407	NKD1
27	TLPDFRLPEI	338	APOB
28	TLQDHLNSL	338	APOB
29	YIQDEINTI	338	APOB
30	YLGEGPRMV	5704	PSMC4
31	YQMDIQQEL	338	APOB
32	ALNAVRLLV	9368	SLC9A3R1
33	LLHGHIVEL	57678	GPAM
34	SLAEGTATV	540	ATP7B

35	SLQESILAQV	23644	EDC4
36	ILNVDGLIGV	47	ACLY
37	LLLPLLPPLSP	347252	IGFBPL1
38	ALADVVHEA	26873	OPLAH
39	ALDPKANFST	10188	TNK2
40	ALLAEGITWV	54499	TMCO1
41	ALLELDEPLVL	2158	F9
42	ALLGGNVRMML	2182	ACSL4
43	ALLGVWTSV	444	ASPH
44	ALQDAIRQL	51268	PIPOX
45	ALQDQLVLV	183	AGT
46	AMAEMKVVL	11283, 4051, 57834, 66002, 8529	CYP4F8,CYP4F3,CYP4F11, CYP4F12,CYP4F2
47	FLDTPIAKV	85407	NKD1
48	FLLEQPEIQV	5345	SERPINF2
49	FLYPEKDEPT	338	APOB
50	FTIPKLYQL	338	APOB
51	GLAEELVRA	5091	PC
52	GLFNAELLEA	3929	LBP
53	GLIHLEGDTV	81494	CFHR5
54	GLLDPNVKSIFV	79033	ERI3
55	GLYGRTIEL	55908	C19orf80
56	GVLPGLVGV	162515	SLC16A11
57	HLTEAIQYV	6097	RORC
58	ILADLNLSV	55705	IPO9
59	ILADTFIGV	222223	KIAA1324L
60	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
61	KIADFELPTI	338	APOB
62	KIAGTNAEV	2752	GLUL
63	KIDEKNFVV	5887	RAD23B
64	KILEETLYV	8443	GNPAT
65	KLFSGDELLEV	8777	MPDZ
66	KLHEEIDRV	1571	CYP2E1
67	KLKETIQKL	338	APOB
68	KLLAATVLLL	336	APOA2
69	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
70	KLLDLETERILL	2803	GOLGA4
71	KLLDNWDSV	335	APOA1
72	KLSEAVTSV	55258	THNSL2
73	KLTLVIISV	8647	ABCB11
74	KLYDLELIV	570	BAAT

75	KQMEPLHAV	284111	SLC13A5
76	LLADIGGDPFAA	3268	AGFG2
77	LLHEENFSV	6942	TCF20
78	LLIDDEYKV	23065	EMC1
79	LLLSTGYEA	23556	PIGN
80	LLYEGKLTL	440107	PLEKHG7
81	NLASFIEQVAV	5092	PCBD1
82	NVFDGLVRV	338	APOB
83	QLHDFVMSL	8647	ABCB11
84	QLTPVLVSV	1244	ABCC2
85	RILPKVLEV	10840	ALDH1L1
86	RLAAFYSQV	91289	LMF2
87	RLFEENDVNL	5053	PAH
88	RLIDRIKTV	60560	NAA35
89	RLIEEIKNV	347051	SLC10A5
90	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
91	RLPDIPLRQV	55656	INTS8
92	RLPPDTLLQQV	5986	RFNG
93	RLYTMDGITV	1571	CYP2E1
94	RMSDVVKGV	113251	LARP4
95	SICNGVPMV	54575, 54576, 54577, 54578, 54579, 54600, 54657, 54658, 54659	UGT1A10,UGT1A8,UGT1A7, UGT1A6,UGT1A5,UGT1A9,UGT1A4,UGT1A1,UGT1A3
96	SLLEEPNVIRV	4703	NEB
97	SLLPQLIEV	338	APOB
98	SLLSPEHLQYL	7512	XPNPEP2
99	SLSAFLPSL	54757	FAM20A
100	SLVGDIGNVNM	1401	CRP
101	SLWEGGVRGV	411	ARSB
102	SLWSVARGV	57678	GPAM
103	SMGDHLWVA	2752	GLUL
104	SVWFGPKEV	28982	FLVCR1
105	SVYDGKLLI	5445	PON2
106	TLAAIIHGA	5243	ABCB1
107	TLGQFYQEV	3700, 375346	ITIH4,TMEM110
108	TLLKKISEA	84675	TRIM55
109	TLYALSHAV	338	APOB
110	TVGGSEILFEV	1401	CRP
111	TVMDIDTSGTFNV	26063, 4833	DECR2,NME4
112	VLGEVKVGV	122622	ADSSL1

113	VLMDKLVEL	338	APOB
114	VLSQVYSKV	338	APOB
115	VVLDDKDYFL	100292290, 3336	HSPE1
116	WVIPAISAV	1528	CYB5A
117	YAFPKSITV	6566	SLC16A1
118	YLDDEKNWGL	5005	ORM2
119	YLDKNLTVSV	100293534, 720, 721	C4A,C4B
120	YLGEEYVKA	7018	TF
121	YLITGNLEKL	1314	COPA
122	YLSQAADGAKVL	2584	GALK1
123	YLWDLDHGFAGV	832	CAPZB
124	LLIDVVTYL	338	APOB
125	ALYGRLEVV	23294	ANKS1A
126	TLLDSPIKV	338	APOB
127	VLIGSNHSL	9919	SEC16A
128	GLAFSLNGV	81502	HM13
129	SQADVIPAV	55034	MOCOS
130	ALDAGAVYTL	10840	ALDH1L1
131	ALDSGAFQSV	55907	CMAS
132	ALHEEVVGV	1593	CYP27A1
133	ALLEMDARL	54512	EXOSC4
134	ALLETNPYLL	1209	CLPTM1
135	ALLGKIEKV	2590	GALNT2
136	ALLNQHYQV	2058	EPRS
137	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
138	ALSQVTLLL	392636	AGMO
139	ALSSKPAEV	256987	SERINC5
140	ALTSISAGV	392636	AGMO
141	AMGEKSFSV	57720	GPR107
142	AVIGGLIYV	366	AQP9
143	FILPDSLPLDTL	6632	SNRPD1
144	FIQLITGV	477, 478	ATP1A2,ATP1A3
145	FLIAEYFEHV	23743, 635	BHMT2,BHMT
146	FLWTEQAHTV	3953	LEPR
147	GLAPGGLAVV	58525	WIZ
148	GLFAPLVFL	6566	SLC16A1
149	GLLSGLDIMEV	383	ARG1
150	GLSNLGIKSI	122553	TRAPPC6B
151	HLAKVTAEV	6184	RPN1
152	KLDNNLDSV	80232	WDR26

153	KLIEVNEEL	100507203	SMLR1
154	KLTDHLKYV	3250	HPR
155	LLEPYKPPSAQ	439	ASNA1
156	LLFPHPVNQV	8518	IKBKAP
157	QLLPNLRAV	5092	PCBD1
158	RIISGLVKV	101060372, 2330	FMO5
159	RLFPDGIVTV	152831	KLB
160	RLLAKIICL	3075	CFH
161	RLLDEQFAV	9026	HIP1R
162	RLMSALTQV	9462	RASAL2
163	RLTESVLYL	368	ABCC6
164	RMLIKLLEV	6710, 6711	SPTB,SPTBN1
165	RVIEHVEQV	3034	HAL
166	SILDIVTKV	130132	RFTN2
167	SLAESSFDV	54658	UGT1A1
168	SLAVLVPIV	1361	CPB2
169	SLFEWFHPL	2519	FUCA2
170	SLHNGVIQL	1314	COPA
171	SLIPAVLTV	57462	KIAA1161
172	SLLNFLQHL	2968	GTF2H4
173	SLTSEIHFL	55755	CDK5RAP2
174	TLAELGAVQV	2875	GPT
175	TLFEHLPHI	2888	GRB14
176	TLGQIWDV	1778	DYNC1H1
177	VLDEPYEKV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1
178	YIFTTPKSV	22862	FNDC3A
179	YIHNILYEV	160518	DENND5B
180	YLGPHIASVTL	81671	VMP1
181	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11,DDX12P
182	YLLHFPMAL	1109	AKR1C4
183	YLYNNEEQVGL	1109	AKR1C4
184	VVLDGGQIVTV	6506	SLC1A2
185	ALFPALRPGGFQA	8878	SQSTM1
186	VLLAQIIQV	89797	NAV2

Tabla 2: Péptidos HLA-A*24 conformes a la presente invención con los números de SEQ ID - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
187	SYPTFFPRF	6596	HLTF
188	RYSAGWDAKF	8630	HSD17B6
189	AFSPDSHYLLF	3679	ITGA7
190	RYNEKCFKL	54800	KLHL24
191	KYPDIISRI	3978	LIG1
192	SYITKPEKW	79694	MANEA
193	IYPGAFVDL	51360	MBTPS2
194	QYASRFVQL	10733	PLK4
195	RYAPPPSFSEF	29066	ZC3H7A
196	AYLKWISQI	60561	RINT1
197	RWPKKSAEF	100132742, 100526842, 6139, 645296, 645441	RPL17P7, RPL17-C18orf32, RPL17, RPL17P39, RPL17P6
198	LYWSHPRKF	6235, 648343	RPS29, RPS29P9
199	KFVTVQATF	718	C3
200	AYLLQPSQF	732	C8B
201	AYVNTFHNI	1201	CLN3
202	AYGTYRSNF	9919	SEC16A
203	YYGILQEKI	10237	SLC35B1
204	KYRLTYAYF	2266	FGG
205	VYGLQRNLL	57159, 84675, 84676	TRIM54, TRIM55, TRIM63
206	KWPETPLLL	55757	UGGT2
207	IYLERFPIF	51096	UTP18
208	SYNPAENAVLL	1314	COPA
209	VFHPRQELI	1314	COPA
210	AYPAIRYLL	7818	DAP3
211	IYIPSYFDF	27042	DIEXF
212	VYGDVISNI	8893	EIF2B5
213	YYNKVSTVF	8661	EIF3A
214	IYVTSIEQI	55879	GABRQ
215	IYTGNISSF	8836	GGH
216	IYADVGEEF	100302182, 11052	MIR1279, CPSF6
217	DYIPYVFKL	338	APOB
218	VYQGAIRQI	338	APOB

Tabla 3: Péptidos adicionales acordes con la presente invención sin vinculación previa conocida con el cáncer - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
219	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
220	SLLEKELESV	1819	DRG2
221	ALCEENMRGV	1938	EEF2

222	LTDITKGV	1938	EEF2
223	FLFNTENKLLL	3422	IDI1
224	ALASVIKEL	28981	IFT81
225	KMDPVAYRV	5859	QARS
226	AVLGPLGLQEV	79178	THTPA
227	ALLKVNQEL	25813	SAMM50
228	YLITSVELL	2182	ACSL4
229	KMFESFIESV	5576	PRKAR2A
230	VLTEFTREV	55705	IPO9
231	RLFNDPVAMV	10195	ALG3
232	KLAEIVKQV	8550	MAPKAPK5
233	ALLGKLDAI	5876	RABGGTB
234	YLEPYLKEV	727947,7381	UQCRB
235	KLFEEIREI	255394	TCP11L2
236	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
237	ALRGEIETV	10128	LRPPRC
238	AMPPPPPQGV	5885	RAD21
239	FLLGFIPAKA	5976	UPF1
240	FLWERPTLLV	79922	MRM1
241	FVLPLLGLHEA	55161	TMEM33
242	GLFAPVHKV	6249	CLIP1
243	GLLDNPELRV	26263	FBXO22
244	KIAELLENV	9100	USP10
245	KLGAVFNQV	23450	SF3B3
246	KLISSYYNV	84928	TMEM209
247	KLLDTMVDTFL	100527963,11243	PMF1-BGLAP,PMF1
248	KLNDLIQRL	1314	COPA
249	LLLGERVAL	23475	QPRT
250	NLAEVVERV	26263	FBXO22
251	RLFADILNDV	64755	C16orf58
252	RTIEYLEEV	3030	HADHA
253	RVPPPPQSV	6464	SHC1
254	RVQEAIAEV	57678	GPAM
255	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
256	SLFQGVEFHYV	3930	LBR
257	SLLEKAGPEL	54625	PARP14
258	SLMGPVVHEV	5116	PCNT
259	TLITDGMRSV	29894	CPSF1
260	TLMDMRLSQV	24148	PRPF6
261	VLFQEALWHV	2194	FASN
262	VLPNFLPYNV	10299	MARCH6

263	VLYPSLKEI	50717,5824	DCAF8,PEX19
264	VMQDPEFLQSV	266971,5710	PIPSL,PSMD4
265	WLIEDGKVVTV	10726	NUDC
266	SLLESNKDLLL	6520	SLC3A2
267	ALNENINQV	80025	PANK2
268	KLYQEVEIASV	5976	UPF1
269	YLMEGSYNKV	5714	PSMD8
270	SVLDQKILL	9875	URB1
271	LLLDKLILL	85440	DOCK7
272	QQLDSKFLEQV	6772	STAT1
273	AILETAPKEV	6238	RRBP1
274	ALAEALKEV	55164	SHQ1
275	ALIEGAGILL	10440	TIMM17A
276	ALLEADVNIKL	6729	SRP54
277	ALLEENSTPQL	83933	HDAC10
278	ALTSVVVTL	1021	CDK6
279	ALWTGMHTI	51479	ANKFY1
280	ATLNIIHSV	51542	VPS54
281	GLLAGDRLVEV	9368	SLC9A3R1
282	GQFPSYLETV	54919	HEATR2
283	ILSGIGVSQV	3703	STT3A
284	KLDAFVEGV	528	ATP6V1C1
285	KLLDLSDSTSV	6093	ROCK1
286	KVLDKVFRA	375056	MIA3
287	LIGEFLEKV	8731	RNMT
288	LLDDSLVSI	25824	PRDX5
289	LLLEEGGLVQV	7353	UFD1L
290	NLIDLDDLYV	57187	THOC2
291	QLIDYERQL	11072	DUSP14
292	RIPAYFVTV	7407	VARS
293	FLASESLIKQI	4736	RPL10A
294	RLIDLHTNV	23256	SCFD1
295	SLFSSPPEI	252983	STXBP4
296	SLLSGRISTL	51133,92799	KCTD3,SHKBP1
297	TLFYSLREV	80233	C17orf70
298	TMAKESSIIGV	1429	CRYZ
299	ALLRVTPFI	401505	TOMM5
300	TLAQQPTAV	4802	NFYC

Tabla 4: Péptidos útiles, entre otros usos, para terapias personalizadas contra el cáncer - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
301	VLADFGARV	114899,23600	C1QTNF3,AMACR
302	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
303	GVYDGEEHSV	4113	MAGEB2
304	SLIDQFFGV	9097	USP14
305	GVLENIFGV	399909	PCNXL3
306	KLVEFDFLGA	10460	TACC3
307	AVVEFLTSV	29102	DROSHA
308	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
309	GLIEIISNA	23020	SNRNP200
310	SLWGGDVVL	157680	VPS13B
311	FLIPIYHQV	31	ACACA
312	RLGIKPESV	1466	CSRP2
313	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
314	YLAPFLRNV	23019	CNOT1
315	KVLDGSPIEV	29974	A1CF
316	LLREKVEFL	4779	NFE2L1
317	KLPEKWESV	26156	RSL1D1
318	KLNEINEKI	1373	CPS1
319	KLFNEFIQL	10885	WDR3
320	GLADNTVIAKV	6897	TARS
321	GVIAEILRGV	10528	NOP56
322	ILYDIPDIRL	10667	FARS2
323	KIIDEDGLLNL	5981	RFC1
324	RLFETKITQV	100293534,720,721	C4A,C4B
325	RLSEAIVTV	51249	TMEM69
326	ALSDGVHKI	55179	FAIM
327	GLNEEIARV	10403	NDC80
328	RLEEDDGDVAM	10482	NXF1
329	SLIEDLILL	64754	SMYD3
330	SMSADVPLV	5111	PCNA
331	SLLAQNTSWLL	7070	THY1
332	AMLAVLHTV	60673	C12orf44
333	GLAEDIDKGEV	1938	EEF2
334	SILTIEDGIFEV	100287551,3306,3312	HSPA8P8,HSPA2,HSPA8
335	SLLPVDIRQYL	6773	STAT2
336	YLPTFFLTV	54898	ELOVL2
337	TLLAAEFLKQV	100288772,10574	CCT7P2,CCT7
338	KLFDSDPITVTV	1191	CLU
339	RLISKFDTV	1977	EIF4E
340	KVFDEVIEV	8908	GYG2

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
341	YLAIGIHEL	3034	HAL
342	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
343	LLLPDYYLV	27044	SND1
344	VYISSLALL (A*24)	10213	PSMD14
345	SYNPLWLRI (A*24)	259266	ASPM
346	LYQILQGIVF (A*24)	983	CDK1
347	ALNPADITV	51497	TH1L
348	AYKPGALTF	84883	AIFM2

La presente invención además concierne en general a los péptidos conformes con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como, por ejemplo, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto, cáncer de riñón, cáncer cerebral y/o leucemias.

Se prefiere especialmente el péptido –solo o en combinación– conforme con la presente invención que consiste en la SEQ ID N.º 255. Más preferibles aún es el péptido de la SEQ ID N.º 255 (véase la Tabla 1), preferiblemente para la unión a A*02 y sus usos en la inmunoterapia contra el CHC, el cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia, pero preferiblemente el CHC.

Tal y como muestran a continuación las tablas 5A y B, muchos de los péptidos acordes con la presente invención también pueden ser utilizados para la inmunoterapia en otras indicaciones. Las tablas muestran los péptidos seleccionados de los cuales se ha hallado sobrepresentación (incluida la presentación específica) en tipos adicionales de tumores en más del 5% de las muestras tumorales cuantificadas, o bien que en más del 5% de las muestras tumorales la relación entre las medias geométricas de la presentación observada en los tejidos tumorales con respecto a los tejidos normales era superior a 3. La sobrepresentación se define como una presentación más alta en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal con mayor presentación. Los tejidos normales utilizados para la comparación de la sobrepresentación son los siguientes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, células sanguíneas, vaso sanguíneo, médula ósea, encéfalo, cartílago, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón,

ganglio linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroides, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroides, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

Tabla 5A: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
1	VMAPFTMTI	Páncreas
6	KLSPTVVGL	Colon, recto
10	SLLEEFDFHV	Riñón
14	ALADLTGTVV	Riñón, cerebro, páncreas
15	LLYGHTVTV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
16	SLLGGNIRL	Cerebro, colon, recto
17	RVAS*PTSGV	Cerebro
22	RIAGIRGIQGV	Riñón, colon, recto
26	SLLHTIYEV	Colon, recto
30	YLGEGPRMV	Colon, recto, LLC
34	SLAEGTATV	Colon, recto
36	ILNVDGLIGV	Riñón, cerebro, colon, recto
39	ALDPKANFST	Riñón, cerebro
41	ALLELDEPLVL	Páncreas
43	ALLGVWTSV	Páncreas
47	FLDTPIAKV	Cerebro, colon, recto
51	GLAEELVRA	Cerebro
54	GLLDPNVKSIFV	Riñón, cerebro
55	GLYGRTIEL	Riñón
58	ILADLNLSV	Páncreas
59	ILADTFIGV	Colon, recto, páncreas
60	ILSPLSVAL	Riñón, páncreas
65	KLFSGDELLEV	Cerebro, colon, recto
69	KLLDEVTYLEA	Colon, recto
70	KLLDLETERILL	Colon, recto
72	KLSEAVTSV	Riñón
77	LLHEENFSV	Riñón, colon, recto
80	LLYEGKLTL	Colon, recto
81	NLASFIEQVAV	Riñón, colon, recto, páncreas
88	RLIDRIKTV	Cerebro, colon, recto

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
90	RLLDVLAPLV	Riñón
96	SLLEEPNVIRV	Riñón
101	SLWEGGVRGV	Cerebro
112	VLGEVKVGV	Riñón
116	WVIPAISAV	Riñón
119	YLDKNLTVSV	Riñón
121	YLITGNLEKL	Riñón, colon, recto, páncreas
123	YLWDLDHGFAGV	Cerebro, colon, recto
125	ALYGRLEVV	Cerebro, colon, recto
127	VLIGSNHSL	Colon, recto
133	ALLEMDARL	Riñón, cerebro, colon, recto
134	ALLETNPYLL	Cerebro
135	ALLGKIEKV	Cerebro, páncreas
137	ALPTVLVGV	Riñón, cerebro, colon, recto
138	ALSQVTLLL	Riñón
139	ALSSKPAEV	Colon, recto, páncreas
141	AMGEKSFSV	Cerebro
144	FIQLITGV	Páncreas
147	GLAPGGLAVV	Cerebro
148	GLFAPLVFL	Riñón
161	RLLDEQFAV	Cerebro
166	SILDIVTKV	Cerebro
169	SLFEWFHPL	Riñón, cerebro, colon, recto
170	SLHNGVIQL	Riñón
172	SLLNFLQHL	Riñón, colon, recto, LLC
173	SLTSEIHFL	LLC
176	TLGQIWDV	Cerebro, colon, recto, páncreas
177	VLDEPYEKV	Riñón
179	YIHNILYEV	Cerebro
181	YLLEKFVAV	Colon, recto
184	VVLDGGQIVTV	Cerebro
186	VLLAQIIQV	Riñón, cerebro, colon, recto
187	SYPTFFPRF	Riñón, cerebro
189	AFSPDSHYLLF	Riñón, cerebro
191	KYPDIISRI	Cerebro
192	SYITKPEKW	Riñón, cerebro
193	IYPGAFVDL	Cerebro
194	QYASRFVQL	Cerebro
195	RYAPPPSFSEF	Cerebro

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
196	AYLKWISQI	Cerebro
197	RWPKKSAEF	Riñón, cerebro
198	LYWSHPRKF	Riñón
199	KFVTVQATF	Cerebro
203	YYGILQEKI	Riñón, cerebro
206	KWPETPLLL	Riñón, cerebro
208	SYNPAENAVLL	Cerebro
214	IYVTSIEQI	Cerebro
219	GVMAGDIYSV	Riñón
220	SLLEKELESV	Cerebro
221	ALCEENMRGV	Riñón, cerebro, colon, recto
223	FLFNTENKLLL	Colon, recto
224	ALASVIKEL	Cerebro
229	KMFESFIESV	Riñón, cerebro, colon, recto
230	VLTEFTREV	Riñón, cerebro, colon, recto
231	RLFNDPVAMV	Cerebro, colon, recto
232	KLAEIVKQV	Colon, recto
233	ALLGKLDAI	Riñón, colon, recto
234	YLEPYLKEV	Riñón, cerebro, colon, recto
236	ALADKELLPSV	Riñón, colon, recto, páncreas
237	ALRGEIETV	Colon, recto
238	AMPPPPPQGV	Cerebro, colon, recto
239	FLLGFIPAKA	Cerebro
240	FLWERPTLLV	LLC
244	KIAELLENV	Cerebro, colon, recto
245	KLGAVFNQV	Cerebro
247	KLLDTMVDTFL	Colon, recto
248	KLNDLIQRL	Páncreas
249	LLLGERVAL	Colon, recto
250	NLAEVVERV	Cerebro, colon, recto, LLC
251	RLFADILNDV	Cerebro, colon, recto
255	SLFGQDVKAV	Riñón, cerebro, colon, recto
258	SLMGPVVHEV	Cerebro
259	TLITDGMRSV	Cerebro
260	TLMDMRLSQV	Riñón, cerebro, colon, recto
261	VLFQEALWHV	Colon, recto
266	SLLESNKDLLL	Colon, recto
268	KLYQEVEIASV	Cerebro
269	YLMEGSYNKV	Cerebro, colon, recto

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
270	SVLDQKILL	Riñón, cerebro
271	LLLDKLILL	Cerebro, colon, recto
272	QQLDSKFLEQV	Riñón, cerebro
274	ALAEALKEV	Colon, recto
275	ALIEGAGILL	Riñón, colon, recto, páncreas
276	ALLEADVNIKL	Páncreas
277	ALLEENSTPQL	Riñón
278	ALTSVVVTL	Riñón, cerebro
279	ALWTGMHTI	Riñón, cerebro
281	GLLAGDRLVEV	Riñón
282	GQFPSYLETV	Riñón, cerebro, colon, recto
283	ILSGIGVSQV	Páncreas
285	KLLDLSDSTSV	Riñón, colon, recto
286	KVLDKVFRA	Páncreas
287	LIGEFLEKV	LLC
288	LLDDSLVSI	Páncreas
289	LLLEEGGLVQV	Riñón, colon, recto, páncreas
290	NLIDLDDLYV	Cerebro, colon, recto, páncreas
291	QLIDYERQL	Riñón, colon, recto, páncreas
292	RIPAYFVTV	Riñón
293	FLASESLIKQI	Cerebro, colon, recto
295	SLFSSPPEI	Riñón, cerebro
296	SLLSGRISTL	Riñón
297	TLFYSLREV	Riñón, cerebro, colon, recto
299	ALLRVTPFI	LLC
300	TLAQQPTAV	Páncreas
301	VLADFGARV	Riñón, colon, recto
302	KIQEILTQV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas, LLC
304	SLIDQFFGV	Cerebro, colon, recto, páncreas
305	GVLENIFGV	Riñón, cerebro
306	KLVEFDFLGA	Cerebro, colon, recto
308	ALLRTVVSV	Riñón, páncreas
309	GLIEIISNA	Cerebro
310	SLWGGDVVL	Cerebro, colon, recto
311	FLIPIYHQV	Riñón, cerebro
312	RLGIKPESV	Cerebro
313	LTAPPEALLMV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
315	KVLDGSPIEV	Riñón
316	LLREKVEFL	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
317	KLPEKWESV	Cerebro, colon, recto, páncreas
319	KLFNEFIQL	Riñón, cerebro, colon, recto
321	GVIAEILRGV	Riñón, cerebro
324	RLFETKITQV	Riñón
325	RLSEAIVTV	Cerebro, páncreas
326	ALSDGVHKI	Páncreas
327	GLNEEIARV	Cerebro, colon, recto
328	RLEEDDGDVAM	Riñón, cerebro, colon, recto
329	SLIEDLILL	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
330	SMSADVPLV	Cerebro, colon, recto
331	SLLAQNTSWLL	Cerebro, colon, recto, páncreas
332	AMLAVLHTV	Cerebro, colon, recto
333	GLAEDIDKGEV	Riñón, cerebro
334	SILTIEDGIFEV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas, LLC
335	SLLPVDIRQYL	Riñón, LLC
336	YLPTFFLTV	Riñón, cerebro
337	TLLAAEFLKQV	Cerebro
338	KLFDSDPITVTV	Cerebro
339	RLISKFDTV	Cerebro
340	KVFDEVIEV	Cerebro
342	AMSSKFFLV	Cerebro, colon, recto, páncreas
343	LLLPDYYLV	Cerebro, páncreas
344	VYISSLALL (A*24)	Cerebro
345	SYNPLWLRI (A*24)	Cerebro
346	LYQILQGIVF (A*24)	Riñón
347	ALNPADITV	Cerebro

Tabla 5B: Péptidos acordes con la presente invención y sus usos específicos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
189	AFSPDSHYLLF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata
273	AILETAPKEV	Cáncer de esófago

236	ALADKELLPSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
14	ALADLTGTVV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de páncreas
38	ALADVVHEA	Cáncer de mama, cáncer de ovario
274	ALAEALKEV	Cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
9	ALANQKLYSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer colorrectal, cáncer de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
224	ALASVIKEL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, Melanoma
221	ALCEENMRGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma
131	ALDSGAFQSV	Cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
185	ALFPALRPGGFQA	Cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
275	ALIEGAGILL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
276	ALLEADVNIKL	Cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de ovario

277	ALLEENSTPQL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
133	ALLEMDARL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
134	ALLETNPYLL	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
135	ALLGKIEKV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
233	ALLGKLDAI	leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
43	ALLGVWTSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de páncreas
227	ALLKVNQEL	Melanoma, cáncer de útero
136	ALLNQHYQV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
299	ALLRVTPFI	Linfoma no hogdkiniano, cáncer de ovario
32	ALNAVRLLV	Cáncer de pulmón microcítico
267	ALNENINQV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, cáncer de células de Merkel, Melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma

137	ALPTVLVGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
45	ALQDQLVLV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral
237	ALRGEIETV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
139	ALSSKPAEV	Cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de útero
278	ALTSVVVTL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
279	ALWTGMHTI	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
125	ALYGRLEVV	Cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
141	AMGEKSFSV	Melanoma
238	AMPPPPPQGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
342	AMSSKFFLV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga

		urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
280	ATLNIIHSV	Cáncer de vejiga urinaria
226	AVLGPLGLQEV	Cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario
202	AYGTYRSNF	Cáncer de pulmón amicrocítico
196	AYLKWISQI	Cáncer de pulmón amicrocítico
210	AYPAIRYLL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico
144	FIQLITGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer cerebral, cáncer de vejiga urinaria
293	FLASESLIKQI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
47	FLDTPIAKV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer de esófago
223	FLFNTENKLLL	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
145	FLIAEYFEHV	Cáncer de pulmón microcítico
239	FLLGFIPAKA	Cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
128	GLAFSLNGV	Melanoma, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
147	GLAPGGLAVV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
148	GLFAPLVFL	Cáncer de esófago, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano

242	GLFAPVHKV	Cáncer de vejiga urinaria
52	GLFNAELLEA	Cáncer de pulmón microcítico
281	GLLAGDRLVEV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
243	GLLDNPELRV	Cáncer de vejiga urinaria
54	GLLDPNVKSIFV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
149	GLLSGLDIMEV	Cáncer de pulmón microcítico
150	GLSNLGIKSI	Cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
55	GLYGRTIEL	Cáncer de pulmón microcítico
282	GQFPSYLETV	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
219	GVMAGDIYSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
151	HLAKVTAEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
57	HLTEAIQYV	Linfoma no hogdkiniano
58	ILADLNLSV	Cáncer de mama
59	ILADTFIGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
36	ILNVDGLIGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero,

		cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
283	ILSGIGVSQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
216	IYADVGEEF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer de próstata
211	IYIPSYFDF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer cerebral, Cáncer gástrico
207	IYLERFPIF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico
193	IYPGAFVDL	Cáncer de pulmón amicrocítico
214	IYVTSIEQI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales
244	KIAELLENV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
62	KIAGTNAEV	Cáncer de mama
63	KIDEKNFVV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
64	KILEETLYV	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
302	KIQEILTQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas

232	KLAEIVKQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
284	KLDAFVEGV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
152	KLDNNLDSV	Cáncer de mama, Melanoma
235	KLFEEIREI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer colorrectal, Melanoma, cáncer de vejiga urinaria
245	KLGAVFNQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
246	KLISSYYNV	Cáncer de ovario
69	KLLDEVTYLEA	Cáncer de vejiga urinaria
70	KLLDLETERILL	Cáncer de ovario, cáncer de útero
285	KLLDLSDSTSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de útero
247	KLLDTMVDTFL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer cerebral, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
8	KLLEEATISV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
248	KLNDLIQRL	Cáncer gástrico, cáncer de útero
20	KLSNVLQQV	Cáncer de pulmón microcítico
6	KLSPTVVGL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario
154	KLTDHLKYV	Cáncer de pulmón microcítico
268	KLYQEVEIASV	Cáncer colorrectal, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria

225	KMDPVAYRV	Cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
229	KMFESFIESV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
286	KVLDKVFRA	Cáncer colorrectal, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
206	KWPETPLLL	Cáncer gástrico
191	KYPDIISRI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico
287	LIGEFLEKV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
288	LLDDSLVSI	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
156	LLFPHPVNQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
77	LLHEENFSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
78	LLIDDEYKV	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
271	LLLDKLILL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
289	LLLEEGGLVQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano

249	LLLGERVAL	Cáncer de ovario
37	LLLPLLPPLSP	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de células de Merkel, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
80	LLYEGKLTL	Cáncer de ovario
15	LLYGHTVTV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
222	LTDITKGV	Cáncer de mama, linfoma no hogdkiniano
346	LYQILQGIVF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer cerebral, cáncer gástrico
198	LYWSHPRKF	Cáncer de pulmón amicrocítico
250	NLAEVVERV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
81	NLASFIEQVAV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
290	NLIDLDDLYV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
291	QLIDYERQL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
157	QLLPNLRAV	Cáncer de células renales
272	QQLDSKFLEQV	Cáncer de células de Merkel, cáncer de ovario, linfoma no hogdkiniano

194	QYASRFVQL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico
22	RIAGIRGIQGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, linfoma no hogdkiniano
292	RIPAYFVTV	Cáncer gástrico, cáncer de mama, melanoma, linfoma no hogdkiniano
86	RLAAFYSQV	Leucemia mieloide aguda
251	RLFADILNDV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
231	RLFNDPVAMV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
294	RLIDLHTNV	Cáncer de esófago
88	RLIDRIKTV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
89	RLIEEIKNV	Cáncer de pulmón microcítico
161	RLLDEQFAV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama
90	RLLDVLAPLV	Cáncer de mama
91	RLPDIPLRQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
92	RLPPDTLLQQV	Cáncer de vejiga urinaria
23	RLYDPASGTISL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, linfoma no hogdkiniano
164	RMLIKLLEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal
94	RMSDVVKGV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
252	RTIEYLEEV	Melanoma

17	RVAJPTSGV	Leucemia mieloide aguda
197	RWPKKSAEF	Cáncer de pulmón amicrocítico
195	RYAPPPSFSEF	Cáncer de pulmón amicrocítico
190	RYNEKCFKL	Cáncer de pulmón amicrocítico
95	SICNGVPMV	Cáncer de vejiga urinaria
166	SILDIVTKV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
24	SLAEEKLQASV	Cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria
169	SLFEWFHPL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
255	SLFGQDVKAV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
256	SLFQGVEFHYV	Cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, Cáncer de células de Merkel, linfoma no hogdkiniano
295	SLFSSPPEI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
170	SLHNGVIQL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
331	SLLAQNTSWLL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, cáncer gástrico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria

10	SLLEEFDFHV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de útero
96	SLLEEPNVIRV	Melanoma, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
257	SLLEKAGPEL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario
220	SLLEKELESV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
266	SLLESNKDLLL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, cáncer de útero
16	SLLGGNIRL	Cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de páncreas
26	SLLHTIYEV	Cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, linfoma no hogdkiniano
172	SLLNFLQHL	Leucemia mieloide aguda
97	SLLPQLIEV	Cáncer de pulmón microcítico
296	SLLSGRISTL	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria
258	SLMGPVVHEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
35	SLQESILAQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, Leucemia mieloide aguda

99	SLSAFLPSL	Cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
11	SLSQELVGV	Cáncer cerebral, melanoma, cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
173	SLTSEIHFL	Cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
101	SLWEGGVRGV	Melanoma
103	SMGDHLWVA	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
330	SMSADVPLV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
129	SQADVIPAV	Cáncer de vejiga urinaria
270	SVLDQKILL	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
104	SVWFGPKEV	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
192	SYITKPEKW	Cáncer de pulmón amicrocítico
208	SYNPAENAVLL	Cáncer de pulmón amicrocítico
345	SYNPLWLRI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, cáncer gástrico
187	SYPTFFPRF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata
300	TLAQQPTAV	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano

297	TLFYSLREV	Cáncer de mama, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
176	TLGQIWDV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
259	TLITDGMRSV	Cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
260	TLMDMRLSQV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
298	TMAKESSIIGV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
110	TVGGSEILFEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
111	TVMDIDTSGTFNV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
209	VFHPRQELI	Cáncer de pulmón amicrocítico
261	VLFQEALWHV	Cáncer de vejiga urinaria
127	VLIGSNHSL	Cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
186	VLLAQIIQV	Melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
262	VLPNFLPYNV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, Melanoma,

		cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
114	VLSQVYSKV	Cáncer de pulmón microcítico
230	VLTEFTREV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
263	VLYPSLKEI	Cáncer de células renales, cáncer de mama, cáncer de útero
1	VMAPFTMTI	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, linfoma no hogdkiniano
264	VMQDPEFLQSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
115	VVLDDKDYFL	Leucemia linfocítica crónica
344	VYISSLALL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, Cáncer colorrectal
265	WLIEDGKVVTV	Melanoma
117	YAFPKSITV	Cáncer de páncreas
178	YIFTTPKSV	Leucemia mieloide aguda
179	YIHNILYEV	Leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano
341	YLAIGIHEL	Cáncer de pulmón microcítico
234	YLEPYLKEV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de

		ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
30	YLGEGPRMV	Cáncer de pulmón amicrocítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
180	YLGPHIASVTL	Melanoma
121	YLITGNLEKL	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
228	YLITSVELL	Cáncer de ovario, linfoma no hogdkiniano
181	YLLEKFVAV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
269	YLMEGSYNKV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
123	YLWDLDHGFAGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
31	YQMDIQQEL	Cáncer de pulmón microcítico
203	YYGILQEKI	Cáncer de pulmón amicrocítico
213	YYNKVSTVF	Cáncer de pulmón amicrocítico

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del péptido acorde con la presente invención conforme con la SEQ ID N.º 255 para – en una forma preferida de realización combinada – el tratamiento del cáncer de colon o el cáncer renal.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un péptido acorde con la presente invención conforme con la SEQ ID N.º 255 para – en una forma preferida de realización combinada – el tratamiento del cáncer de riñón.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención conforme con la SEQ ID N.º 255 para – en una forma preferida de realización combinada – el tratamiento del cáncer de cerebro.

De forma similar, los péptidos como los enumerados en la anterior Tabla 5B pueden ser la base –en una forma de realización combinada preferida– para el tratamiento de las enfermedades tal y como se indica.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los péptidos acordes a la presente invención para el tratamiento –preferentemente combinado– de una enfermedad proliferativa seleccionada del grupo siguiente: CHC, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto, y leucemia.

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

La presente invención se refiere, además, a péptidos acordes con la presente invención en que cada uno de dichos péptidos consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 255.

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en particular en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias/inmunopatológicas.

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

La presente invención concierne, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en concreto de TCR solubles (TCRs) y TCR clonados y sintetizados en linfocitos T autólogos o alogénicos, y con métodos para fabricarlos, así como con linfocitos citolíticos naturales

(o células NK) u otro tipo de células que sean portadoras de dichos TCR o reaccionen de forma cruzada con dichos TCR.

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 255, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que

expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos conforme a la presente invención.

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al uso acorde con la presente invención, en que las células cancerosas son células de CHC, de cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia, pero preferiblemente células de CHC.

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

Existen dos tipos de moléculas MHC: Las MHC de clase I y las MHC de clase II. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores MHC de clase II). Su conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos procedentes de la proteólisis mayoritariamente de proteínas endógenas, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) y péptidos grandes. Las moléculas MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan principalmente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC mediante endocitosis y después procesadas por las mismas. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de epítopos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) que sean reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos reviste suma importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que estimulen respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic S, et al. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Jul 22;100(15):8862-7). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Mortara L, et al. CIITA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. Clin Cancer Res. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3435-43) que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células

NK, macrófagos o granulocitos (Hwang ML, et al. Cognate memory CD4+ T cells generated with dendritic cell priming influence the expansion, trafficking, and differentiation of secondary CD8+ T cells and enhance tumor control. J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):5829-38).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como por ejemplo monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con cáncer se ha descubierto que las células del tumor expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel J, et al. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. Clin Cancer Res. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4163-70).

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

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

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores aun sin el concurso de los

linfocitos T CD8-positivos a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN-γ).

Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan directamente como agentes efectores antitumorales (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

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

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, esto es, los epítopos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están regulados al alza en las células del tumor correspondiente.

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

Para desencadenar la respuesta inmunitaria celular el péptido de MHC de clase I ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 12 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados («anclaje») en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de

MHC. De este modo cada alelo MHC posee un “motivo de unión” que determina qué péptidos se pueden unir específicamente a la hendidura de unión.

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

La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores 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 están 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. La especificidad (o asociación) tumoral de un péptido también puede surgir si el péptido procede de un exón del (asociado con) tumor en el caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas con el mismo).

e) TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítopos nuevos en tumores como sucede con MUC1 o de 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 de cuello uterino.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. En una forma de realización preferida, el péptido debe ser presentado en exceso por las células tumorales con respecto a los tejidos sanos

normales. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítopos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

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

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluidas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de linfocitos T que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o están basados en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales.

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T

con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítopo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, en una forma de realización muy preferida de la invención es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos que sean presentados en exceso o de forma selectiva contra los cuales se encuentre un linfocito T funcional y/o proliferativo. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

En el caso de 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.

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

La expresión diferencial de COL18A1 ha sido descrita en el cáncer de vejiga, en tumores rabdoideos y en el carcinoma ovárico, y se ha demostrado que algunos polimorfismos específicos del gen aumentan el riesgo de cáncer de mama esporádico (Fang et al., 2013; Gadd et al., 2010; Peters et al., 2005; Lourenco et al., 2006).

Los cambios en la expresión del gen COPA y en la edición de su ARN parecen estar vinculados con el carcinoma hepatocelular y un estudio experimental reveló efectos antiapoptósicos de COPA en células de mesotelioma (Sudo et al., 2010; Qi et al., 2014; Wong et al., 2003).

La actividad de CPB2 aparece reducida significativamente en la leucemia promielocítica aguda (Meijers et al., 2000).

La CRP, una proteína de fase aguda sintetizada por el hígado, es un marcador pronóstico de diversos tipos de cáncer, entre ellos el carcinoma de células renales y el mieloma múltiple (Ljungberg, 2007; Fassas and Tricot, 2004).

CRYZ es un gen diana del oncosupresor p53 (Bansal et al., 2011). Codifica la proteína zeta-cristalina, la cual interactúa directamente con el ARNm de la molécula antiapoptósica bcl-2 y estabiliza la sobreexpresión de bcl-2 en la leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (Lapucci et al., 2010).

La sobreexpresión de CSRP2 está asociada con la desdiferenciación del carcinoma hepatocelular (Midorikawa et al., 2002).

CYB5A codifica una enzima que desintoxica las moléculas cancerígenas y es un factor pronóstico del cáncer de páncreas (Blanke et al., 2014; Giovannetti et al., 2014).

Los niveles elevados de expresión de CYP27A1 han sido vinculados con el carcinoma de endometrio, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal (Bergada et al., 2014; Nelson et al., 2013; Matusiak and Benya, 2007).

La sobreexpresión del CYP2E1 ha sido descrita en el cáncer colorrectal, en polimorfismos específicos que están asociados con el cáncer de vejiga y de pulmón, así como en células de cáncer de mama . (Ye et al., 2014; Patel et al., 2014; Deng et al., 2014; Leung et al., 2013).

CYP2J2 es una enzima que aparece sobreexpresada en diversos tipos de cáncer humano, como el cáncer de esófago, pulmón, mama, estómago, hígado y colon . (Jiang et al., 2005; Narjoz et al., 2014).

CYP4F8 se expresa intensamente en el cáncer de próstata (Vainio et al., 2011).

CYP4F2 y CYP4F3 aparecen ambos sobreexpresados en el adenocarcinoma ductal de páncreas y el CYP4F2 en el cáncer de ovario (Gandhi et al., 2013; Alexanian et al., 2012).

Se ha demostrado que la expresión de CYP4F11 está regulada por NF-κB y p53 (Kalsotra et al., 2004; Bell and Strobel, 2012; Goldstein et al., 2013).

Las variantes genéticas de CYPAF12 están asociadas significativamente con la respuesta a la gemcitabina en los pacientes con cáncer de páncreas (Goldstein et al., 2013; Harris et al., 2014).

Los niveles elevados de DAP3 aparecen correlacionados con respuestas más favorables a la quimioterapia en el cáncer gástrico y un mejor resultado clínico en el cáncer de mama, pero por la otra se ha descrito su sobreexpresión en tumores oncocíticos de la tiroides y en el glioblastoma invasivo(Jia et al., 2014; Wazir et al., 2012; Jacques et al., 2009; Mariani et al., 2001).

PEX19 es esencial para la biogenia de los peroxisomas, pero también parece interactuar directamente con p19ARF, lo que en última instancia conduce a la retención de este factor en el citoplasma y a la inactivación de la función oncosupresora de p53 (Sugihara et al., 2001).

DDX11, perteneciente a la familia DEAH de las helicasas de ADN, se expresa fuertemente en el melanoma avanzado (Bhattacharya et al., 2012).

NME4 es una nucleósido difosfato-cinasa que aparece sobreexpresada en el cáncer de colon y gástrico, así como en el síndrome mielodisplásico, en esta última enfermedad asociada con un pronóstico malo (Kracmarova et al., 2008; Seifert et al., 2005).

DENND5B actúa como factor de intercambio de GDP-GTP para activar a las Rab-GTPasas (Yoshimura et al., 2010).

DIEXF media en la degradación no proteosómica del oncosupresor p53 (Tao et al., 2013).

DOCK7 es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que aparece sobreexpresado en el glioblastoma y que aumenta la invasión de las células del mismo en respuesta al factor HGF al activar a Rac-1 (Murray et al., 2014).

En estirpes celulares de carcinoma hepatocelular, DRG2 ha demostrado estar regulado a la baja durante la apoptosis inducida por los antineoplásicos, y su sobreexpresión inhibe la apoptosis provocada por la doxorrubicina en tales células (Chen et al., 2012a).

DROSHA, una de las dos enzimas críticas en la biosíntesis de los microARN, aparece sobreexpresada en diversos tipos de cáncer como los tumores gastrointestinales, el cáncer de mama y el de cuello uterino y parece estimular la proliferación, la formación de colonias y la migración de las células tumorales (Avery-Kiejda et al., 2014; Havens et al., 2014; Zhou et al., 2013b).

Polimorfismos mononucleotídicos del gen DUSP14 están vinculados con un riesgo de melanoma anómalo (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013b).

Un estudio de secuenciación del exoma entero descubrió mutaciones somáticas en el gen DYNC1H1 en pacientes con neoplasia mucinosa papilar intraductal del páncreas (Furukawa et al., 2011).

La proteína EEF2 aparece sobreexpresada en el cáncer de pulmón, de esófago, páncreas, mama y próstata, en el glioblastoma multiforme y en el linfoma no hodgkiniano, y actúa como oncógeno en el crecimiento de las células cancerosas (Oji et al., 2014; Zhu et al., 2014a).

Se han detectado mutaciones del gen EFR3A en muestras de adenoma colorrectal (Bojjireddy et al., 2014; Zhou et al., 2013a).

EIF2B5 codifica una subunidad del factor B de iniciación de la traducción. En este gen se han descrito polimorfismos mononucleotídicos que se han vinculado con el tiempo de supervivencia en el cáncer de ovario (Goode et al., 2010).

EIF3A, la subunidad A del factor 3 de inicio de la traducción eucariota, está sobreexpresado en los tumores de mama, pulmón, cuello de útero, esófago, estómago y colon, y se ha demostrado su intervención en la regulación del ciclo celular (Dong and Zhang, 2006).

EIF4E es un potente oncogén que aparece elevado hasta en el 30% de las neoplasias malignas humanas, entre ellas los carcinomas de mama, próstata, pulmón, cabeza y cuello, así como en muchas leucemias y linfomas.

ELOVL2 se ha demostrado su sobreexpresión en el carcinoma hepatocelular (Jakobsson et al., 2006; Zekri et al., 2012).

EPRS codifica una aminoacil-ARNt-sintetasa multifuncional, que ha sido descrita como un antígeno asociado a tumor en el cáncer de colon (Line et al., 2002).

La actividad del promotor del EXOSC4 aumenta en el carcinoma hepatocelular, debido a la hipometilación del ADN. EXOSC4 inhibe de forma eficaz y específica el crecimiento de las células cancerosas y la capacidad invasiva celular (Drazkowska et al., 2013; Stefanska et al., 2014).

La enzima hidrolítica FUCA2 resulta ser esencial para la adhesión de *Helicobacter pylori* a las células de cáncer gástrico humanas. (Liu et al., 2009a).

GABRQ codifica la subunidad theta del receptor GABAA. El GABA estimula el crecimiento del carcinoma hepatocelular humano mediante la sobreexpresión de la subunidad theta del receptor GABAA (Li et al., 2012).

En el carcinoma de células escamosas se ha descrito que la sobreexpresión de GALNT2 refuerza el potencial invasivo de las células tumorales mediante la modificación de la O-glucosilación y la actividad del EGFR (Lin et al., 2014; Hua et al., 2012a; Wu et al., 2011).

Los niveles altos de GGH han sido asociados con la resistencia celular a los antifolatos, en particular contra el metotrexato y con un pronóstico malo en el cáncer de mama invasivo y en los tumores endocrinos pulmonares (Schneider and Ryan, 2006; Shubbar et al., 2013; He et al., 2004).

GLUL aparece sobreexpresado en las células del carcinoma de mama humano y en los astrocitomas (Zhuang et al., 2011; Collins et al., 1997; Christa et al., 1994; Cadoret et al., 2002).

Se ha descrito a GNPAT como implicado en la inhibición del crecimiento y en la inducción de la apoptosis en el melanoma metastásico (Ofman et al., 2001; Qin et al., 2013).

Se han descrito deleciones en la región cromosómica del GOLGA4 en el carcinoma del cuello uterino y la fusión «en marco» del ARNm del GOLGA4 con el del PDGFRB en neoplasias mieloproliferativas (Senchenko et al., 2003; Hidalgo-Curtis et al., 2010).

GPAM se expresa en el cáncer de mama humano, donde está asociado con cambios en el metabolismo celular y una mejor supervivencia global (Brockmoller et al., 2012).

La elevación de los niveles de GPT en el suero aumenta supuestamente el riesgo de cáncer gastrointestinal y está asociada con la carcinogenia y la recurrencia del carcinoma hepatocelular inducido por el virus de la hepatitis C (Kunutsor et al., 2014; Tarao et al., 1997; Tarao et al., 1999).

Se ha demostrado que la GRB14 aparece regulada al alza en el cáncer de mama, donde la expresión elevada estuvo asociada significativamente con mejor supervivencia sin enfermedad y global (Huang et al., 2013; Balogh et al., 2012).

Se han descrito polimorfismos mononucleotídicos en el gen GTF2H4 que incrementarían el riesgo de cáncer de pulmón vinculado con el tabaquismo y del cáncer de cuello uterino inducido por el virus del papiloma (Mydlikova et al., 2010; Buch et al., 2012; Wang et al., 2010).

Diversos estudios parecen atribuir una función importante del HSPA2 en la progresión de la enfermedad del cáncer de cuello uterino, el carcinoma de células renales y el cáncer de vejiga urinaria. Algunos polimorfismos de este gen están asociados con el desarrollo del cáncer gástrico (Singh and Suri, 2014; Ferrer-Ferrer et al., 2013; Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b).

HSPA8 aparece sobreexpresado en el carcinoma epidermoide esofágico. Asimismo, HSPA8 aparece sobreexpresado en el mieloma múltiple y en el carcinoma de colon, y la expresión inducida por el BCR-ABL1 del HSPA8 promueve la supervivencia celular en la leucemia mieloide crónica (Dadkhah et al., 2013; Wang et al., 2013a; Chatterjee et al., 2013; Kubota et al., 2010; Jose-Eneriz et al., 2008).

MDN1 ha sido descrito como un candidato a gen oncosupresor, que aparece mutado en los tumores de mama del tipo luminal B (Cornen et al., 2014).

MIA3, también llamada proteína 1 de organización del Golgi y de transporte (TANGO), aparece regulada a la baja en los carcinomas de colon y hepatocelular, y desempeña un papel oncosupresor en ambas entidades (Arndt and Bosserhoff, 2007). En cambio, un estudio sobre el carcinoma epidermoide oral indica la relación de la expresión de MIA3 con la progresión tumoral, la formación de metástasis y el estadio clínico, lo cual apunta hacia un efecto oncógeno del mismo (Sasahira et al., 2014).

CPSF6 ha sido identificado como un gen componente del «casete génico preparado» (*Poised gene cassette*, PGC) asociado con diferencias significativas en el potencial invasivo y metastásico de varios tipos de tumores, como el cáncer de mama, colon, hígado, pulmón, esófago y tiroides (Yu et al., 2008).

Se ha descrito que los bajos niveles de expresión de MPDZ están asociados con un mal pronóstico en las pacientes con cáncer de mama (Martin et al., 2004).

NAA35, también llamado MAK10, codifica la subunidad auxiliar NatC de la N(alfa)-acetil-transferasa 35. En pacientes con carcinoma epidermoide esofágico se ha detectado un ARN quimérico GOLM1-MAK10 altamente expresado en el cáncer, que codifica una proteína de fusión segregada que podría servir como marcador molecular (Zhang et al., 2013b).

Se ha demostrado que NAV2 se expresa específicamente en un grupo de tumores de colon y el tratamiento de células de ese tipo de cáncer con oligonucleótidos antisentido contra NAV2 indujo su apoptosis (Ishiguro et al., 2002).

La sobreexpresión de NCSTN es indicadora de una peor supervivencia global en las pacientes con cáncer de mama negativo para el receptor de estrógenos y se han detectado niveles elevados de nicastrina y de Notch4 en células de cáncer de mama resistente a hormonoterapia, en que la activación desemboca en un comportamiento invasivo (Sarajlic et al., 2014; Lombardo et al., 2014).

En el cáncer de pulmón amicrocítico la proteína NKD1 aparece reducida, pero su ARNm aparece elevado, estando lo primero relacionado con el incremento del potencial invasivo y con un mal pronóstico (Zhang et al., 2011). El ARNm de la NKD1 también se halla elevado en células de tumores de colon humanos (Yan et al., 2001; Zhang et al., 2011).

En el cáncer de esófago se ha descrito su asociación con la metástasis ganglionar, mientras que su sobreexpresión en el cáncer de próstata propiciaría un bloqueo de la división celular (Hatakeyama et al., 2006; Lin et al., 2004).

Un estudio que investigaba el papel de la vía de señalización Notch en el cáncer de ovario describió una mayor frecuencia de expresión del RFNG en el adenoma respecto al carcinoma (Gu et al., 2012; Hopfer et al., 2005).

RINT1 ha sido descrito como oncogén en el glioblastoma multiforme y como un gen de sensibilidad al cáncer moderadamente penetrante en el cáncer de mama, así como en cánceres relacionados con el síndrome de Lynch (Ngeow and Eng, 2014; Quayle et al., 2012).

Se ha hallado que la expresión elevada de RORC está vinculada con una supervivencia sin metástasis más larga en el cáncer de mama. La expresión atenuada de RORC en adenomas somatotrofos está relacionada con el aumento del tamaño tumoral y con una respuesta clínica mermada al tratamiento con somatostatina (Cadenas et al., 2014; Lekva et al., 2013).

Se ha descrito que RPL17 promueve la multirresistencia farmacológica al suprimir la apoptosis estimulada por los fármacos (Shi et al., 2004b).

Se ha descrito el aumento de la expresión de RPS29 en el cáncer gástrico y colorrectal (Takemasa et al., 2012; Sun et al., 2005).

SAMM50 codifica un componente de la Maquinaria de clasificación y montaje (SAM, *Sorting and Assembly Machinery*) de la membrana externa mitocondrial, que interviene en el montaje de las proteínas con barriles beta en dicha membrana. Se ha detectado un ARNm quimérico promotor del crecimiento (SAMM50-PARVB) en células de cáncer de mama y de ovario, así como en diversas muestras de cáncer de mama, estómago, colon, riñón y útero (Plebani et al., 2012).

SERPINF2 codifica el inhibidor principal de la plasmina, que degrada la fibrina y otras proteínas. El nivel plasmático del complejo inhibidor de la plasmina/alfa-2-plasmina ha demostrado ser un predictor de la supervivencia en el carcinoma de pulmón amicrocítico y se ha observado la baja actividad de la alfa-2-antiplasmina en la sangre de pacientes con carcinoma prostático (Zietek et al., 1996; Taguchi et al., 1996).

La sobreexpresión de SF3B3 está correlacionada significativamente con la supervivencia global y la hormonorresistencia en el cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos (Gokmen-Polar et al., 2014).

Los niveles de la proteína SHC1 aparecen elevados en el cáncer de próstata, en el de mama metastásico, en el de ovario y en el de tiroides, y se cree que diversas isoformas actúan como proteína adaptadora primaria que media las señales mitógenas de los esteroides a nivel no genómico (Alam et al., 2009; Rajendran et al., 2010).

AMACR es usado como biomarcador en el cáncer el próstata puesto que aparece notablemente sobreexpresado en esta entidad (Wu et al., 2014). Asimismo, ha sido usado como marcador inmunohistoquímico para el diagnóstico del carcinoma de células renales (Ross et al., 2012).

Datos experimentales apuntan a que la expresión de C1QTNF3 podría intervenir en el crecimiento tumoral del osteosarcoma, asociado con la activación de la vía de señalización de ERK1/2 y que es una nueva adipocina antiapoptósica que protege a las células madre mesenquimáticas de la apoptosis inducida por la privación de suero/hipoxia a través de la vía de señalización de PI3K/Akt (Hou et al., 2014; Akiyama et al., 2009).

GPC3 se expresa en la mayoría de los carcinomas hepatocelulares. En estos momentos se están estudiando dos estrategias terapéuticas contra el CHC que tienen como diana el GPC2 en ensayos clínicos de fase II: Un anticuerpo monoclonal humanizado anti-

GPC3 y una vacuna que consiste en dos péptidos derivados del GPC3. Los péptidos usados en el segundo estudio son distintos del péptido presentado en el presente documento. La expresión de GPC3 también ha sido detectada en todos los tumores del saco vitelino, algunos carcinomas epidermoides de pulmón y en carcinomas de células claras del ovario (Filmus and Capurro, 2013; Kandil and Cooper, 2009).

MAGEB2 está clasificado como un antígeno de cáncer-testículo, puesto que se expresa en los testículos y en la placenta, así como en una fracción significativa de tumores de diversos tipos histológicos, entre ellos el mieloma múltiple y el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Pattani et al., 2012; Van et al., 2011).

MAPKAPK5 codifica un oncosupresor y es miembro de la familia de las serina/treonina-cinasas. MAPKAPK5 aparece infraexpresada en el cáncer colorrectal, lo que provoca un aumento de la actividad de la oncoproteína myc y un descenso de la formación tumoral al suprimir la actividad oncogénica de ras en un modelo de cáncer hematopoyético en ratón (Yoshizuka et al., 2012; Kress et al., 2011).

La sobreexpresión de USP14 está asociada con el aumento de la proliferación de las células tumorales y con un pronóstico malo en el cáncer de ovario epitelial, el cáncer de pulmón amicrocítico y el cáncer colorrectal (Wang et al., 2015; Wu et al., 2013a; Shinji et al., 2006).

C4A ha sido descrito como biomarcador del síndrome de ovario poliquístico y del cáncer endometrial, y los datos experimentales apuntan a que C4 puede mediar en el crecimiento tumoral (Galazis et al., 2013; Rutkowski et al., 2010).

Se ha descrito su sobreexpresión en carcinomas epidermoides orales positivos para el papilomavirus humano 18 y ha sido identificado como *locus* de sensibilidad al cáncer de próstata (Lo et al., 2007; Nwosu et al., 2001).

Los polimorfismos mononucleotídicos del gen CFHR5 están asociados con la supervivencia sin progresión en el linfoma folicular (Charbonneau et al., 2012).

CLIP1 codifica la proteína de enlace 1 portadora de dominio CAP-GLY, que liga las vesículas endocíticas a los microtúbulos. Este gen aparece fuertemente expresado en las células de Reed-Sternberg del linfoma de Hodgkin y en el cáncer de mama, y parece estar implicado en la migración y la invasión de las células de cáncer de mama y cáncer de páncreas (Sun et al., 2013; Suzuki and Takahashi, 2008; Li et al., 2014a; Sun et al., 2012).

CLU inhibiría la progresión tumoral, mientras que en la neoplasia avanzada parece conferir una supervivencia sustancialmente mayor al tumor al suprimir muchos factores estresantes terapéuticos y potenciar la metástasis. Se ha demostrado que CLU desempeña un papel crítico en la patogenia del cáncer de próstata, al regular el comportamiento agresivo de las células del carcinoma de células renales claras humano a través de la modulación de la señalización del ERK1/2 y de la expresión de la MMP-9 y conferir resistencia al tratamiento en los estadios avanzados del cáncer de pulmón (Trougakos, 2013; Panico et al., 2009; Takeuchi et al., 2014; Wang et al., 2014).

Se ha descrito que el gen de fusión SEC16A-NOTCH1 es un primer gen de fusión recurrente en el cáncer de mama (Edwards and Howarth, 2012).

En el cáncer de próstata y en el de cuello uterino se ha observado la deleción recurrente del gen SHQ1, de lo que se deduce su papel como oncosupresor (Krohn et al., 2013; Lando et al., 2013).

En los carcinomas de células renales claras y en el cáncer de vejiga la expresión elevada de SLC16A1 ha sido vinculada con factores de pronóstico negativo y anticipa la progresión del tumor. En el cáncer colorrectal los polimorfismos mononucleotídicos del gen SLC16A1 podrían influir en los resultados clínicos y pueden ser usados para predecir

la respuesta a la quimioterapia adyuvante (Kim et al., 2015; Fei et al., 2014a; Fei et al., 2014a).

Está demostrado que el glioblastoma libera glutamato en grandes cantidades, lo que tal vez estimule la proliferación de las células tumorales y facilite la invasión tumoral, a la par que regula a la baja el SLC1A2, lo cual está correlacionado con un grado del tumor más alto, de lo que se deduce su posible papel en la progresión de los tumores gliales. Asimismo, en el cáncer gástrico se ha detectado un gen de fusión del SLC1A2 con el CD44 que podría constituir una clase de fusión génica que crearía un medio metabólico propicio para la oncogenia que favorecería el crecimiento y la supervivencia del tumor (Tao et al., 2011; de Groot et al., 2005).

La expresión elevada de SLC3A2 está asociada con el crecimiento tumoral, la agresividad biológica y la supervivencia de los pacientes con cáncer de las vías biliares y contribuye significativamente al pronóstico negativo de los pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico mediante la proliferación celular a través de la vía de PI3K/Akt. Asimismo, la sobreexpresión del SLC3A2 junto con la de las integrinas ß1 y ß3 y de Fak está asociada con la progresión y las metástasis hepáticas del cáncer colorrectal (Kaira et al., 2014; Fei et al., 2014b; Sun et al., 2014).

Existen indicios de la implicación del SLC9A3R1 en el desarrollo tumoral en el carcinoma hepatocelular, el schwannoma, el glioblastoma, el cáncer colorrectal y, especialmente, en el cáncer de mama (Saponaro et al., 2014).

Se ha descrito que el NFYC promueve la expresión de oncogenes en las células del cáncer gástrico y del cáncer de próstata (Zhang et al., 2014a; Gong et al., 2013).

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

TIMM17A aparece sobreexpresado en células de cáncer de mama 21T y la expresión de su ARNm en los tejidos de cáncer de mama apareció correlacionada con la progresión tumoral (Xu et al., 2010).

TMEM209 se expresa ampliamente en el cáncer de pulmón. (Fujitomo et al., 2012).

TNK2, también llamado tirosina-cinasa ACK1, aparece activado, amplificado o mutado en una amplia variedad de cánceres humanos. La cinasa desregulada es oncogénica y su activación aparece correlacionada con la progresión al estadio metastásico. Los inhibidores de la ACK1 han demostrado resultados alentadores en estudios preclínicos (Mahajan and Mahajan, 2013).

TRIM55 codifica una proteína RING con dedos de zinc que está vinculada con los microtúbulos, la miosina y la titina durante el montaje del sarcómero muscular y también está implicada en la señalización entre el sarcómero y el núcleo (Pizon et al., 2002).

La interferencia del ARN de la proteína Ufd1 puede sensibilizar a la estirpe de células de cáncer de colon resistentes a la hidroxicamptotecina SW1116/HCPT a esta última sustancia (Chen et al., 2011a; Chen et al., 2011c).

En el cáncer colorrectal el gen UGT1A1 aparece silenciado por metilación y, por tanto, se considera el objetivo de la investigación relativa a la farmacorresistencia al irinotecán (CPT-11) y a los mecanismos de control para revertir tal resistencia (Xie et al., 2014).

UGT1A10 se expresa en el tejido gástrico y biliar (Strassburg et al., 1997) y su sobreexpresión aumenta significativamente la citotoxicidad del agente antitumoral 5-dimetilaminopropilamino-8-hidroxitriazoloacridinona C-1305 (Pawlowska et al., 2013). Asimismo, UGT1A10 cataliza la glucuronidación de xenobióticos, mutágenos y metabolitos reactivos y por tanto actúa como antioxidante indirecto. Se han detectado elementos de respuesta frente a xenobióticos (XRE) y antioxidantes (ARE) en los promotores de UGT1A8, UGT1A9 y UGT1A10 (Kalthoff et al., 2010).

UGT1A8 se expresa fundamentalmente en el tubo digestivo (Gregory et al., 2003) y la expresión de su ARNm aparece regulada al alza tras el tratamiento con el agente quimiopreventivo sulforafano (SFN) (Wang et al., 2012).

El haplotipo de UGT1A7 está asociado con un aumento del riesgo de carcinoma hepatocelular en portadores de la hepatitis B (Kong et al., 2008).

UGT1A6 está sobreexpresado en células de cáncer de mama resistentes al metotrexato (De Almagro et al., 2011) e inducido por la β-naftoflavona, un posible agente quimiopreventivo (Hanioka et al., 2012).

UGT1A9 se expresa principalmente en el hígado y en los riñones (Gregory et al., 2003). Los polimorfismos germinales de UGT1A9 son predictores potenciales de la recurrencia del cáncer de próstata tras la prostatectomía (Laverdiere et al., 2014).

Los polimorfismos del promotor y de la región codificante del UGT1A4 generan variabilidad en la glucuronidación del anastrozol, un inhibidor de la aromatasa para las pacientes con cáncer de mama (Edavana et al., 2013).

UPF1 forma parte de la maquinaria de degradación del ARNm mediada por mutaciones sin sentido (NMD) y podría cumplir un cometido funcional en la progresión y la metástasis del cáncer de próstata (Yang et al., 2013). Además, el gen de vigilancia del ARN UPF1aparece con frecuencia mutado en el carcinoma adenoescamoso de páncreas (Liu et al., 2014).

UQCRB es una subunidad del complejo mitocondrial III. La inhibición del UQCRB en las células tumorales suprime la angiogenia tumoral inducida por la hipoxia (Jung et al., 2013). Dos polimorfismos mononucleotídicos en la región no traducida 3' del UQCRB son candidatos a marcadores pronósticos del cáncer colorrectal (Lascorz et al., 2012).

Las alteraciones en el número de copias de USO1 están correlacionadas con la expresión génica diferencial en el melanoma de propagación superficial con respecto al melanoma nodular (Rose et al., 2011).

Se han detectado reducciones significativas de la expresión de las proteínas USP10 y SIRT6 en tumores de cáncer de colon humanos (Lin et al., 2013).

UTP18 también altera la traducción para promover la resistencia al estrés y el crecimiento, y con frecuencia se halla presente y sobreexpresado en el cáncer (Yang et al., 2014b).

El polimorfismo rs2074511 de VARS ha aparecido vinculado con la supervivencia en pacientes con cáncer de mama de tipo triple negativo y, por tanto, podría considerarse un factor pronóstico de la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama inicial (Chae et al., 2011).

VMP1, una proteína asociada a la autofagia inducida por el estrés, también es estimulada por el oncogén KRAS (Lo Re et al., 2012). VMP1 se sobreexpresa en el cáncer de páncreas humano escasamente diferenciado como respuesta a los fármacos antineoplásicos (Gilabert et al., 2013). Se ha hallado una regulación a la baja significativa del VMP1 en los tejidos de CHC humano y aparece estrechamente correlacionado con la afectación multiganglionar, ausencia de formación capsular, invasión venosa y pronóstico malo del CHC (Guo et al., 2012).

WDR26 protege las células miocárdicas contra el estrés oxidativo (Feng et al., 2012).

ZC3H7A forma parte de la familia de proteínas con dedos de zinc CCCH conocidas por ser reguladoras de la activación de los macrófagos (Liang et al., 2008). En el caso del ZC3H7A se han hallado frecuencias alélicas elevadas de mutaciones funcionales en el tumor metastásico del adenocarcinoma ductal de páncreas (Zhou et al., 2012).

FASN es una sintasa de ácidos grasos que interviene en la síntesis de lípidos potenciada que se da en diferentes tipos de cáncer, como de mama, páncreas, próstata, hígado, ovario, colon y endometrio (Wu et al., 2014; Zhao et al., 2013).

MO5 es una monooxigenasa que es la FMO hepática dominante, y está regulada al alza en los tumores de mama positivos para el receptor de estrógenos alfa (Bieche et al., 2004; Zhang and Cashman, 2006).

El ARNm de HADHA se reduce a medida que progresa la desdiferenciación en el CHC (Tanaka et al., 2013) y en los tumores de mama negativos para el receptor de estrógenos alfa (Mamtani and Kulkarni, 2012).

La variación genética del gen HAL podría estar implicada en el desarrollo del cáncer de piel (Welsh et al., 2008).

HLTF pertenece a la familia SWI/SNF de reguladores transcripcionales con actividad helicasa y ubiquitina-ligasa E3, y ha sido hallado inactivado por hipermetilación en tumores de colon, estómago, útero, vejiga y pulmón (Debauve et al., 2008; Castro et al., 2010; Garcia-Baquero et al., 2014).

HDAC10 es una histona-desacetilasa y un regulador transcripcional. La expresión de HDAC10 apareció notablemente reducida en tejidos de cáncer gástrico en comparación con los tejidos adyacentes (Jin et al., 2014). HDAC10 aparece inversamente relacionado con la metástasis ganglionar en las pacientes con carcinoma epidermoide de cuello uterino (Song et al., 2013). HDAC10 está hipermetilado en tumores malignos de la corteza suprarrenal (Fonseca et al., 2012). Los niveles de HDAC10 están elevados en la leucemia linfocítica crónica (Wang et al., 2011). El polimorfismo del promotor HDAC10-589C>T apareció asociado de manera significativa con la aparición del CHC en pacientes con hepatitis B crónica, así como con la aceleración del CHC en pacientes de ese tipo (Park et al., 2007). La reducción de la expresión de los genes de la histona-desacetilasa

de clase II está asociada con un pronóstico negativo en los pacientes con cáncer de pulmón (Osada et al., 2004).

HM13 es una peptidasa de péptido señal que influye en la viabilidad celular en el adenoma colorrectal (Sillars-Hardebol et al., 2012).

Las concentraciones en suero de HPR en los pacientes con linfoma maligno fueron notablemente superiores a las de los grupos de control sanos, y la expresión de la HPR aumentó en paralelo con la progresión de la enfermedad (Epelbaum et al., 1998). La expresión de HPR corre paralela al potencial maligno en el cáncer de mama, y es más probable que los tumores de este tipo que son positivos para la HPR experimenten recidivas tras la resección primaria, además de estar asociados con intervalos sin enfermedad más breves (Shurbaji et al., 1991).

Una variante (rs932335) del gen HSD11B1 está asociada con el cáncer colorrectal y el de mama (Feigelson et al., 2008; Wang et al., 2013b).

La expresión de HSD17B6 en tejidos de pacientes con cáncer de próstata sometidos a tratamiento supresor de andrógenos (ADT) fue significativamente superior que en los tejidos de individuos no tratados (Ishizaki et al., 2013).

HSPE1 es una chaperona mitocondrial con funciones en el plegamiento de proteínas y señalización celular (vías de NF-kappaB y WNT). El incremento de los niveles de Hsp10 se ha detectado en células tumorales de cáncer de intestino grueso, cáncer exocervical, cáncer de próstata, linfoma de células del manto y cáncer de ovario seroso. En la carcinogenia bronquial, se ha descrito la disminución de los niveles de Hsp10 (David et al., 2013).

Los xenoinjertos de carcinoma ovárico trasplantados en los costados de ratones atímicos y tratados con paclitaxel mostraron una expresión reducida de IDI1 en comparación con los xenoinjertos no tratados (Bani et al., 2004).

IGFBPL1 es un regulador de los factores de crecimiento insulinoides que aparece regulado a la baja en estirpes de células de cáncer de mama por efecto de una hipermetilación aberrante. La metilación de IGFBPL1 ha aparecido claramente asociada con peor supervivencia global y peor supervivencia sin enfermedad (Smith et al., 2007).

La proteína asociada a microsomas y sensible a andrógenos IKBKAP moduló la expresión de marcadores neuronales y del epitelio prostático, atenuó la proliferación a través de un mecanismo dependiente del receptor de andrógenos, y correguló la transcripción mediada por dicho receptor en células de adenocarcinoma de próstata LNCaP (Martinez et al., 2011).

INTS8 forma parte de un panel de marcadores que permite diferenciar a los carcinomas gástricos de los tejidos adyacentes no cancerosos (Cheng et al., 2013).

El péptido derivado de la IRS2 pIRS-21097-1105 apareció presente en melanomas HLA-A2(+) y en carcinomas de mama, ovario y colorrectales (Zarling et al., 2014). El genotipo IRS-2 1057 DD y el alelo D han aparecido asociados significativamente con el riesgo de CHC (Rashad et al., 2014).

ITGA7 es la cadena alfa de la integrina dimérica alfa-7/beta-1 del receptor de la laminina 1. ITGA7 es un gen oncosupresor crítico para la supresión del crecimiento de los tumores malignos. El análisis funcional ha revelado mutaciones de *ITGA7* en el cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, leiomiosarcoma de partes blandas y glioblastoma multiforme. ITGA7 apareció regulado a la baja en el cáncer de próstata no metastásico y en el leiomiosarcoma (Tan et al., 2013).

ITIH4 apareció regulado a la baja en diversos tejidos tumorales como los de colon, estómago, ovario, pulmón, riñón, recto y próstata (Hamm et al., 2008). Los bajos niveles séricos de ITIH4 están asociados con una supervivencia menor en los pacientes con CHC vinculado al HBV (Noh et al., 2014). En el cáncer de mama se han observado

concentraciones séricas notablemente elevadas de ITIH4, niveles que descendieron sustancialmente tras la extirpación quirúrgica (Van, I et al., 2010).

En el SHKBP1 se ha descubierto una mutación sin sentido que actúa en pasos ulteriores a FLT3, una tirosina-cinasa de receptor que aparece mutada en cerca del 30% de los casos de LMA (Greif et al., 2011).
SHKBP1 es uno de los diversos candidatos a biomarcador proteico para la clasificación de los tumores neuroendocrinos del intestino delgado diferenciados (WD-SI-NET, por sus siglas en inglés) en diferentes estadios de la enfermedad (Darmanis et al., 2013).

KIAA1161 es una proteína transmembrana de la membrana nuclear que guarda homología con la glucosidasa y que está implicada en la diferenciación de los mioblastos (Datta et al., 2009).

La expresión de KLB está elevada en los tejidos afectados por el CHC con respecto al tejido no tumoral similar (Poh et al., 2012).

El polimorfismo de LBP rs2232596 está asociado con un riesgo significativamente mayor de carcinoma colorrectal en los chinos de la etnia Han (Chen et al., 2011b). LBP es un candidato a biomarcador sérico en el carcinoma ovárico (Boylan et al., 2010). LBP apareció reducido significativamente tras el tratamiento con quimioterapia en pacientes con carcinoma de pulmón microcítico (Staal-van den Brekel AJ et al., 1997).

La expresión del ARNm de LBR apareció asociada directamente con el grado del tumor y con el Índice pronóstico de Nottingham para el cáncer de mama (Wazir et al., 2013). LBR se expresa intensamente en las células de carcinoma papilar de tiroides, pero el plegamiento anormal de la proteína podría explicar su carencia de reactividad inmunohistoquímica y estar relacionado con el plegamiento anómalo de la membrana nuclear (Recupero et al., 2010).

Se ha descrito la desregulación de LEPR en diversas células malignas tales como las de cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de mama y cáncer de pulmón (Ntikoudi et al., 2014; Surmacz, 2013; Uddin et al., 2011).

Algunos polimorfismos mononucleotídicos de LIG1 están relacionados con el riesgo de cáncer de pulmón, cáncer de endometrio y glioma (Doherty et al., 2011; Lee et al., 2008; Liu et al., 2009b).

La expresión de LRPPRC en tejidos de cáncer gástrico es significativamente superior a la del tejido control similar (Li et al., 2014b). Los niveles de LRPPRC sirven como marcador pronóstico en los pacientes con adenocarcinomas prostáticos (PCA), pues aquellos con niveles altos sobreviven menos tiempo tras la operación quirúrgica que los que presentan niveles bajos (Jiang et al., 2014). LRPPRC se expresa abundantemente en varios tipos de tumores, como el adenocarcinoma de pulmón, el carcinoma epidermoide de esófago, los adenocarcinomas de estómago, colon, mama y endometrio, así como en el linfoma (Tian et al., 2012).

La expresión de MANEA está regulada por los andrógenos en las células del cáncer de próstata (Romanuik et al., 2009).

OPLAH se expresa en los tejidos normales y tumorales de pulmón, mama, riñón, colon y ovario, y en algunos pacientes sus niveles son notablemente superiores en las muestras normales con respecto a los tumores (Srivenugopal and Ali-Osman, 1997).

Las glucoformas de ORM2 aportan información valiosa para distinguir entre el cáncer hepático primario y secundario (Mackiewicz and Mackiewicz, 1995). Se ha confirmado que los niveles plasmáticos de ORM2 están significativamente elevados en pacientes aquejados por carcinoma colorrectal comparados con los controles (Zhang et al., 2012). Los niveles de la glucoforma fucosilada de ORM2 resultaron significativamente mayores en casos de adenocarcinoma de pulmón con respecto a los controles (Ahn et al., 2014).

ORM2 es un presunto marcador para el diagnóstico precoz del colangiocarcinoma (Rucksaken et al., 2012).

Los niveles elevados de tetrahidrobiopterina provocan un incremento de la actividad de la PAH y de la proteína PAH en células de hepatoma humano (McGuire, 1991).

PARP14 se expresa intensamente en células plasmáticas del mieloma y está vinculado con la progresión de la enfermedad y una supervivencia poco halagüeña. PARP14 está implicada críticamente en la supervivencia dependiente de la JNK2. PARP14 parece promover la supervivencia de las células de mieloma al unirse e inhibir a la JNK1 (Barbarulo et al., 2013).

Los niveles de PC aparecen elevados en los tumores hepáticos y en el cáncer de pulmón (Chang and Morris, 1973; Fan et al., 2009).

Se han descrito niveles elevados de PCNT y de anomalías centrosómicas en diversas neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos, entre ellas la LMA, la LMC, linfoma de células del manto, cáncer de mama y cáncer de próstata (Delaval and Doxsey, 2010).

PIGN es un gen supresor de la inestabilidad cromosómica ligada al cáncer (CIN) que experimenta con frecuencia una pérdida del número de copias en el cáncer colorrectal CIN(+) (Burrell et al., 2013).

La expresión de PIPOX varía según el subtipo de cáncer de mama, pues los tumores de tipo HER-2 presentan una expresión elevada en tanto que el cáncer de mama triple negativo la presente reducida. La negatividad del tumor para PIPOX ha aparecido asociada a una supervivencia sin progresión de la enfermedad más breve(Yoon et al., 2014). PIPOX ha aparecido reducida en tumores de próstata y redujo el potencial oncogénico de las células prostáticas al metabolizar la sarcosina (Khan et al., 2013).

Se han detectado niveles elevados de PSMD4 en el cáncer de colon, el mieloma y el carcinoma hepatocelular (Arlt et al., 2009; Midorikawa et al., 2002; Shaughnessy, Jr. et al., 2011).

PLIN2 aparece notablemente elevado en los pacientes con carcinoma de células renales claras y renal papilar con respecto a los controles. Las concentraciones preoperatorias de PLIN2 en la orina reflejan el tamaño y el estadio del tumor (Morrissey et al., 2014). La expresión de PLIN2 es significativamente más alta en especímenes de adenocarcinoma de pulmón que en los tejidos normales y en los carcinomas epidermoides de pulmón (Zhang et al., 2014b).

PLK4 sufre con frecuencia una reorganización o pérdida en el cáncer humano, con un porcentaje especialmente alto en los carcinomas hepatocelulares, pero también en el cáncer colorrectal y en el cáncer de cabeza y cuello (Swallow et al., 2005). PLK4 aparece sobreexpresado en el cáncer de mama (Marina and Saavedra, 2014).

QARS pertenece a las aminoacil-ARNt-sintetasas (ARS) e incorpora glutamina a los ARNt. La expresión y los polimorfismos de la ARS están relacionados con el cáncer de mama y el glioblastoma (He et al., 2014b; Kim et al., 2012).

El gen PMF1 metilado es un biomarcador diagnóstico y pronóstico en los pacientes con cáncer vesical (Kandimalla et al., 2013).

PON2 aparece regulada al alza en varios tumores humanos y neoplasias malignas hematológicas, incluida la glándula tiroides, próstata, páncreas, testículos, endometrio/útero, cáncer de hígado y riñón, tejidos linfoides, tumores de vejiga urinaria, LLA y LMC, y dicha sobreexpresión confirió resistencia contra diferentes antineoplásicos (imatinib, doxorrubicina, estaurosporina y actinomicina) (Witte et al., 2011).

PRKAR2A es una subunidad reguladora de la proteína-cinasa A. PRKAR2A aumenta de manera muy acusada la supervivencia de estirpes celulares de cáncer de próstata

tratadas con taxol y docetaxel (Taxotere) (Zynda et al., 2014). PRKAR2A aparece sobreexpresada en el adenocarcinoma de pulmón (Bidkhori et al., 2013).

PRPF6 pertenece al complejo del spliceosoma tri-snRNP (ribonucleoproteína pequeña) que dirige la proliferación del cáncer de colon mediante el corte y empalme preferencial de los genes vinculados a la regulación del crecimiento (Adler et al., 2014). PRPF6 aparece sobreexpresada en el adenocarcinoma de pulmón (Bidkhori et al., 2013).

PSMC4 aparece regulada al alza de manera sustancial y uniforme en células de carcinoma de próstata en comparación con el tejido prostático normal adyacente (Hellwinkel et al., 2011).

La expresión de QPRT aumenta con la malignidad del glioma y, en los glioblastomas recidivantes tras la quimiorradioterapia, su expresión está relacionada con un pronóstico malo (Sahm et al., 2013). QPRT es un posible marcador para el cribado inmunohistoquímico de los nódulos foliculares de la tiroides (Hinsch et al., 2009).

RABGGTB está sobreexpresada en el linfoma de linfocitos B grandes difuso y refractario a la quimioterapia (Linderoth et al., 2008).

RAD21 está sobreexpresada en los tumores gastrointestinales, el carcinoma colorrectal, el cáncer de endometrio avanzado, el cáncer de próstata y el cáncer de mama (Atienza et al., 2005; Deb et al., 2014; Porkka et al., 2004; Supernat et al., 2012; Xu et al., 2014).

RAD23B podría intervenir en la progresión del cáncer de mama (Linge et al., 2014). El polimorfismo mononucleotídico rs1805329 de RAD23B ha aparecido significativamente asociado con el desarrollo y la recurrencia del CHC en pacientes japoneses portadores del HCV (Tomoda et al., 2012).

RASAL2 es una proteína activadora de la GTPasa Ras con funciones oncosupresoras en el cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos, el cáncer de ovario y el

cáncer de pulmón (Li and Li, 2014; Huang et al., 2014). En cambio, RASAL2 actúa como oncógeno en el cáncer de mama triple negativo e impulsa la invasión del mesénquima y la metástasis (Feng et al., 2014a).

La eliminación de RNMT inhibe de forma efectiva y específica el crecimiento de las células cancerosas y su capacidad invasiva en diferentes tipos de cáncer, entre ellos el hepático (Stefanska et al., 2014).

Se ha descrito la sobreexpresión de ROCK1 o mutaciones en dicho gen que propician un aumento de la actividad cinasa en varios tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón, carcinoma gástrico, LMC y LMA (Rath and Olson, 2012).

RPL10A es un gen diana para c-Myc y podría contribuir a la transformación de los hepatocitos (Hunecke et al., 2012).

Los puntos de ruptura Inv(3) y t(3;3), relacionados con un pronóstico especialmente negativo en la leucemia mieloide o la mielodisplasia, se concentran en una región centromérica situada por detrás del gen RPN1 (Wieser, 2002).

RRBP1 aparece sobreexpresado en el cáncer de pulmón y de mama (Telikicherla et al., 2012; Tsai et al., 2013).

La expresión de SCFD1 aparece elevada en la gastritis erosiva, que está vinculada con el carcinoma gástrico (Galamb et al., 2008).

ABCB1 codifica la glucoproteína P (P-gp), que se expresa en las células normales de diversos órganos como son el intestino, hígado, riñón, cerebro y la placenta. Se ha detectado la sobreexpresión y varios polimorfismos genéticos de la P-gp en el carcinoma colorrectal, en tumores de las glándulas suprarrenales, en el cáncer de pulmón y en la LLA (Zhang et al., 2013a; Fojo et al., 1987; Gervasini et al., 2006; Jamroziak et al., 2004).

ABCB10 codifica un transportador ABC de la subfamilia B (MDR/TAP). Se ha demostrado que ABCB10 está implicado en la resistencia al cisplatino en las células de carcinoma epidermoide humano KCP-4 (Oiso et al., 2014).

Se ha demostrado que la expresión de ABCB11 está regulada al alza en el adenocarcinoma ductal de páncreas, uno de los tipos de cáncer más farmacorresistentes, por lo que podría contribuir a la respuesta generalmente mala del mismo a los tratamientos (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013).

La expresión al alza de ABCC2 en los carcinomas primarios de trompa de Falopio está asociada con un pronóstico malo (Halon et al., 2013).

ABCC6 apareció regulado a la baja en el cáncer colorrectal de pacientes que no respondían a la quimioterapia paliativa (Hlavata et al., 2012). En cambio, apareció regulado al alza en células humanas A549 de carcinoma de pulmón amicrocítico resistentes a la gemcitabina (Ikeda et al., 2011).

La expresión de ACACA está regulada al alza en numerosos tipos de cáncer humanos, entre ellos el carcinoma de mama, próstata e hígado y aparece correlacionada con la potenciación de la lipogenia de las células cancerosas. Los diferentes inhibidores de ACACA han manifestado un efecto terapéutico en el tratamiento de estirpes de células tumorales a través de la supresión de la proliferación y de la inducción de la muerte celular por apoptosis (Zu et al., 2013).

ACLY se expresa aberrantemente en varios tumores, como los de mama, hígado, colon, pulmón y próstata, y está correlacionada a la inversa con el estadio y la diferenciación del tumor (Zu et al., 2012).

ACSL3 aparece sobreexpresada en el cáncer de pulmón y, a tenor de estudios preclínicos, es una prometedora diana terapéutica para dicho cáncer (Pei et al., 2013).

La expresión regulada al alza de ACSL3 podría servir como biomarcador del riesgo del cáncer de mama específico del receptor de estrógenos (Wang et al., 2013c).

ACSL4 aparece sobreexpresada en los tumores de mama negativos para el receptor de estrógenos y en los tumores de próstata y de mama negativos para el receptor de andrógenos. La pérdida de sensibilidad a las hormonas esteroideas ha aparecido asociada con la inducción de la expresión de ACSL4 (Monaco et al., 2010). Se ha comprobado que la regulación al alza de ACSL4 comienza durante la transformación del adenoma en adenocarcinoma (Cao et al., 2001).

La metilación de ACSS3 parece estar relacionada con al menos uno de los factores de riesgo clásicos del neuroblastoma, esto es, edad, estadio o el estado del gen MYCN (Decock et al., 2012).

La deleción de ADSSL1 se ha observado con frecuencia en adenocarcinomas primarios de pulmón de ratón inducidos por carcinógenos, en estirpes de células de adenocarcinoma de ratón y humanas, y está asociada con un fenotipo de inestabilidad cromosómica más amplia en tumores primarios de pulmón de ratón (Miller et al., 2009).

AGFG2 ha sido identificada como uno de los 14 candidatos a gen pronóstico para detectar los casos de cáncer de mama triple negativos o negativos para hormonorreceptores que probablemente no sufrirán recidivas metastásicas (Yau et al., 2010).

AGT es un factor antiangiogénico sumamente potente que ha demostrado ejercer efectos antitumorales en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Bouquet et al., 2006). En ratones transgénicos, la sobreexpresión del AGT humano ha demostrado reducir la angiogenia y disminuir así la progresión tumoral en el hepatocarcinoma (Vincent et al., 2009).

AKR1C4 codifica el miembro C4 de la familia de la aldo-cetorreductasa 1 humana que cataliza la reducción del retinaldehído en retinol (Ruiz et al., 2011). Por consiguiente, la

eliminación del retinaldehído regula a la baja la biosíntesis del ácido retinoico que se ve seguida por el bloqueo de la vía de señalización de los retinoides, lo cual favorece la progresión tumoral (Tang and Gudas, 2011; Ruiz et al., 2012).

La expresión de ALDH1L1 ha demostrado estar regulada a la baja en el CHC y en los gliomas. La regulación a la baja de ALDH1L1 en tales tipos de cáncer se ha relacionado con un pronóstico más negativo y un fenotipo más agresivo (Rodriguez et al., 2008; Chen et al., 2012b).

La expresión de ALG3 ha demostrado estar potenciada en el carcinoma epidermoide de esófago y en el cáncer del cuello uterino (Shi et al., 2014; Choi et al., 2007). En el carcinoma epidermoide de esófago el aumento de la expresión de ALG3 apareció correlacionado con la metástasis ganglionar (Shi et al., 2014).

ANKS1A ha sido identificada como una nueva diana de la familia de cinasas Src que son conocidas por estar implicadas en el desarrollo de algunos cánceres colorrectales (Emaduddin et al., 2008).

APOA1 codifica la apolipoproteína A-1, el principal componente proteico de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) del plasma. En múltiples modelos animales de tumor, la APOA1 ha evidenciado una potente acción inmunomoduladora en la oncogenia y ha demostrado suprimir el crecimiento y la metástasis tumorales al sustentar procesos del sistema inmunitario innato y adaptativo (Zamanian-Daryoush et al., 2013).

Se ha demostrado que la APOA2 se reduce notablemente en los pacientes con cáncer de páncreas (Honda et al., 2012). Por el contrario, el aumento de su expresión se ha vinculado con el CHC (Liu et al., 2007).

En el CHC vinculado con el HBV y negativo para la alfa-fetoproteína, la APOB ha resultado ser una de las 14 proteínas expresadas diferencialmente que podrían estar asociadas con la progresión de dicho cáncer (He et al., 2014a). En el cáncer de mama

avanzado, APOB ha resultado ser una de las seis proteínas con expresión diferencial que podrían predecir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y la supervivencia sin recidiva de las pacientes (Hyung et al., 2011).

En los pacientes con cáncer colorrectal en estadio III y en las células de melanoma humanas, la AQP9 apareció asociada con mayor quimiorresistencia (Dou et al., 2013; Gao et al., 2012).

ARG1 ha demostrado ser un marcador sensible y específico para distinguir el CHC de otros tumores metastásicos del hígado (Sang et al., 2013). ARG1 podría contribuir a la supresión de la inmunidad local en el carcinoma de pulmón amicrocítico (Rotondo et al., 2009).

La forma fosforilada, y por tanto más activa, de la proteína ARSB ha resultado estar elevada en los leucocitos periféricos de pacientes con leucemia mielógena crónica con respecto a los de los donantes sanos (Uehara et al., 1983).

En las células de cáncer de ovario se ha demostrado que la regulación a la baja de ASNA1 aumenta la sensibilidad a los antineoplásicos siguientes: cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y arsenito (Hemmingsson et al., 2009).

Se ha demostrado que ASPH está sobreexpresada en varios tipos de cáncer y de estirpes de células cancerosas (Yang et al., 2010). La inmunización con células dendríticas cargadas con ASPH generó citotoxicidad contra células de colangiocarcinoma en condiciones *in vitro* y suprimió sustancialmente el crecimiento tumoral intrahepático y la metástasis (Noda et al., 2012).

ATP1A2 es una de las 31 proteínas halladas como reguladas significativamente al alza en el glioblastoma (Com et al., 2012). En cambio, ATP1A2 ha aparecido regulada a la baja en neuroblastomas metastásicos infiltrados en la médula ósea (Morandi et al., 2012).

ATP1A3 es una de las 31 proteínas halladas como reguladas significativamente al alza en el glioblastoma (Com et al., 2012).

ATP6V1C1 podría promover el crecimiento del cáncer de mama y de las metástasis óseas a través de la regulación de la actividad de la V-ATPasa lisosómica. La reducción de la expresión del ATP6V1C1 inhibió sustancialmente el crecimiento, la metástasis y las lesiones osteolíticas derivadas de xenoinjertos de células tumorales de mama de ratón 4T1 en condiciones *in vivo* (Feng et al., 2013). ATP6V1C1 ha demostrado estar sobreexpresado en el carcinoma epidermoide oral y asociado con la movilidad de las células tumorales (Otero-Rey et al., 2008).

ATP7B está vinculada con la resistencia del cáncer al cisplatino, un antineoplásico de amplio uso (Dmitriev, 2011).

AXIN2 codifica la proteína 2 relacionada con la axina (inhibición del eje), que presumiblemente juega un papel importante en la regulación de la estabilidad de la beta-catenina en la vía de señalización de Wnt (Salahshor and Woodgett, 2005). Asimismo, AXIN2 ha demostrado reprimir la expresión del oncogén c-MYC (Rennoll et al., 2014).

En el CHC, la baja expresión de BAAT ha aparecido asociada con una supervivencia peor respecto a los pacientes en los que la expresión era más elevada (Furutani et al., 1996).

Se ha demostrado el fuerte descenso de los transcritos de BHMT y BHMT2 en células HepG2 y en muestras de CHC con respecto al tejido hepático normal (Pellanda et al., 2012).

C12orf44 ha demostrado ser esencial para la autofagia e interacciona con ULK1 de modo dependiente de Atg13 (Mercer et al., 2009). La autofagia desempeña dos cometidos opuestos en el cáncer, actuando al mismo tiempo como oncosupresor al evitar la

acumulación de proteínas y de orgánulos dañados, y como mecanismo de supervivencia celular que puede promover el crecimiento de los tumores consolidados (Yang et al., 2011b).

C17orf70 es un componente del complejo central de la anemia de Fanconi y resulta esencial para la estabilidad de dicho complejo. El complejo central de la anemia de Fanconi desempeña un papel crucial en la red de respuesta a los daños sufridos por el ADN. La respuesta al daño del ADN mediada por dicho complejo implica a los productos génicos de sensibilidad del cáncer de mama BRCA1 y BRCA2 (Ling et al., 2007).

Se ha demostrado que C19orf80 codifica el genTD26 asociado al carcinoma hepatocelular, que ha demostrado ser uno de los cinco *locus* con mayores niveles de metilación en el CHC y menores en el tejido de control (Ammerpohl et al., 2012).

Se ha descubierto que CCT7 forma parte de una red secundaria de proteínas que es notablemente diferenciadora del cáncer colorrectal humano avanzado (Nibbe et al., 2009).

Se ha comprobado que la CDK6 regula la actividad de la proteína oncosupresora Rb. CDK6 puede ejercer su función oncopromotora al potenciar la proliferación y estimular la angiogenia (Kollmann et al., 2013). Se ha observado que la inhibición farmacológica de CDK6 inhibe la diferenciación durante el crecimiento de las células leucémicas anormales (Placke et al., 2014).

CFH podría intervenir en la progresión del carcinoma espinocelular de la piel (Riihila et al., 2014). CFH podría desempeñar un papel clave en la resistencia a la lisis mediada por el complemento en varias células cancerosas y se ha demostrado su sobreexpresión en el carcinoma de pulmón amicrocítico, que aparece relacionada con un pronóstico más negativo (Cui et al., 2011).

Del gen CLPTM1 se ha hallado una mutación inactivadora en el cáncer de próstata (Rossi et al., 2005).

CMAS codifica la citidina monofosfato-ácido N-acetilneuramínico-sintetasa, que cataliza la activación del ácido siálico y de su transformación en un diéster de monofosfato de citidina. El ácido siálico activado es destinado a la N-glucosilación, una modificación postraduccional habitual durante la diferenciación celular. El aumento de la expresión de los glúcidos con ácido siálico en la superficie de las células cancerosas es una de las características tumorales mejor conocidas (Bull et al., 2014).

La transferrina (TF) es uno de los ligandos tumorales más utilizados, porque los receptores de TF (TFR) están sobreexpresados en las células malignas y desempeñan un papel clave en la captación del hierro celular a través de su interacción con la transferrina (Biswas et al., 2013). Se ha sugerido que el nivel de expresión de los receptores TFR está correlacionado con el estadio tumoral o con la progresión del cáncer (Tortorella and Karagiannis, 2014).

TH1L podría tener un papel relevante en la regulación de la proliferación y de la invasión en el cáncer de mama humano y podría servir como diana terapéutica contra ese cáncer (Zou et al., 2010).

La hidrólisis mediada por la THTPA podría ser la responsable de los efectos antiproliferativos del Ndrg-1. La Ndrg-1 ha demostrado reducir la capacidad invasiva y la metástasis en el cáncer de mama, colon, próstata y páncreas (Kovacevic et al., 2008).

SMYD3 promueve la invasión tumoral por la regulación al alza a través de mecanismos epigenéticos de la metaloproteinasa MMP-9 (Medjkane et al., 2012). La expresión del SMYD3 es indetectable o ínfima en muchos tipos de tejido humano normal, en tanto que su sobreexpresión ha sido vinculada con el desarrollo y la progresión del cáncer gástrico, colorrectal, hepatocelular, de próstata y de mama (Hamamoto et al., 2006; Liu et al., 2014; Liu et al., 2013a).

Se ha observado un vínculo entre STAT2 y la oncogenia en ratones transgénicos carentes de STAT2 (Yue et al., 2015) o cuyo cerebro expresaba constitutivamente el IFN-α (Wang et al., 2003).

TACC3 aparece sobreexpresada en muchos tipos de cáncer humanos, como el cáncer de ovario, cáncer de mama, carcinoma epidermoide y linfoma (Ma et al., 2003; Jacquemier et al., 2005; Lauffart et al., 2005).

SPBP también reprime la actividad transcripcional del receptor de estrógenos α (ERα). La sobreexpresión del SPBP inhibió la proliferación de una estirpe celular de cáncer de mama dependiente del ERα (Gburcik et al., 2005). En el núcleo celular, la SPBP muestra una movilidad relativamente baja y aparece concentrada en las regiones de cromatina densa, lo cual indica con claridad que es una proteína afín a la cromatina (Darvekar et al., 2012). TCF20 es importante para la potenciación de la inducción de las proteínas implicadas en el programa defensivo celular contra el estrés oxidativo (Darvekar et al., 2014).

C3 es un elemento destacado del microentorno inflamatorio del tumor (Rutkowski et al., 2010) cuya activación podría ser positiva para el crecimiento del tumor (Markiewski et al., 2008). La hidrólisis enzimática de C3 conduce a la producción de la anafilotoxina C3a, un mediador inflamatorio y quimiotáctico, así como de C3b (Sahu et al., 1998).

CLN3 es un gen antiapoptósico en células precursoras neuronales NT2 y en unos pocos tipos de cáncer (Zhu et al., 2014b). Interviene en el tráfico y en la regulación intracelular en células neuronales y no neuronales (Rakheja et al., 2008; Getty and Pearce, 2011) y está implicado en varias vías de señalización importantes(Persaud-Sawin et al., 2002). El ARNm y la proteína del CLN3 están sobreexpresados en diversas estirpes de células tumorales, entre ellas de mama, colon, melanoma maligno, próstata, ovario, neuroblastoma y glioblastoma multiforme, pero no en cambio en estirpes de cáncer de pulmón y de páncreas (Rylova et al., 2002).

SLC13A5 es uno de los 7 genes marcadores del fenotipo metilador de las islas CpG (CIMP). El fenotipo CIMP de los carcinomas renales de células claras se caracteriza por la acumulación de la metilación del ADN en las islas de CpG y un pronóstico más negativo para el paciente (Tian et al., 2014; Arai et al., 2012).

Además, SLC35B2 interviene en la regulación transcripcional coordinada durante la inducción de la biosíntesis del sulfo-glucano de Lewis X (Le^x) sializado en la inflamación aguda (Huopaniemi et al., 2004) y en la sulfatación del epítopo 6-sulfolactosamina en una estirpe de células de carcinoma colorrectal humano(Kamiyama et al., 2006). Tanto estirpes celulares de carcinoma colorrectal como los tejidos colorrectales humanos expresan la SLC35B2 (Kamiyama et al., 2011).

La expresión de PLOD1 está asociada con la progresión del cáncer de mama humano (Gilkes et al., 2013).

PRDX5 aparece regulada al alza en numerosos tumores malignos (Urig and Becker, 2006) y su inhibición puede impedir la iniciación y la progresión del tumor, lo cual la señala como una diana prometedora en el tratamiento contra el cáncer. Su centro activo con selenocisteína, altamente nucleófilo y accesible, podría servir como diana de primer orden para el diseño de fármacos (Liu et al., 2012).

El aumento de la expresión de PSMD8 en el pulmón periférico podría aportar información sobre las principales poblaciones celulares implicadas en el desarrollo de tumores malignos invasivos (Zhou et al., 1996).

SNRPD1 es una proteína importante del spliceosoma, que está regulada al alza en tumores malignosLa reducción de la expresión del SPTBN1 está relacionada con el empeoramiento del pronóstico del cáncer de páncreas (Jiang et al., 2010).

SQSTM1 actúa como nodo de señalización de varias vías de transducción de la señal, como las del NF-κB, la apoptosis y la activación del Nrf2, cuya desregulación está vinculada con la osteopatía de Paget y la oncogenia (Komatsu et al., 2012).

La expresión de PCNA predice la supervivencia en el melanoma anorrectal maligno (Ben-Izhak et al., 2002). Se conoce una isoforma de PCNA asociada con el cáncer (caPCNA) que contiene un patrón inusual de grupos metiléster en numerosos residuos de ácido glutámico y aspártico (Hoelz et al., 2006).

La eliminación del SRP54 en varias estirpes de células tumorales no generó fenotipos celulares manifiestos, como la parálisis del crecimiento o la muerte, ni siquiera en células escogidas por la reducción estable de componentes del SRP (Ren et al., 2004).

A nivel molecular, STAT1 inhibe la proliferación de células tumorales humanas y de ratón tratadas con IFN-γ a través de su capacidad para aumentar la expresión del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21Cip1, o de reducir la expresión de c-myc (Ramana et al., 2000). La actividad antitumoral de STAT1 se ve reforzada por su capacidad para inhibir la angiogenia y la metástasis tumoral en modelos de ratón (Huang et al., 2002). Se ha demostrado que el aumento de los niveles del ARNm de STAT1 forma parte de una firma molecular asociada con una predicción más favorable del resultado metastásico en las pacientes con cáncer de mama triple negativo y negativo para los receptores hormonales (Yau et al., 2010).

Muestras de neoplasias foliculares tomadas por aspiración con aguja fina demuestran que los nódulos malignos sobreexpresan la STT3A en comparación con la enfermedad benigna (Patel et al., 2011).

Un metanálisis ha evidenciado que el polimorfismo rs6504950 de STXBP4/COX11 aparece correlacionado significativamente con el riesgo de cáncer de mama (Tang et al., 2012).

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

La presente invención se refiere, además, a un péptido conforme a la presente invención, en que dicho péptido está modificado y/o incluye enlaces no peptídicos tal y como se describe más adelante.

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, a anticuerpos tal y como se describen más adelante, y a los métodos para fabricarlos. Se prefieren anticuerpos que sean específicos para los péptidos de la presente invención, y/o para los péptidos de la presente invención cuando están unidos a su MHC. Los anticuerpos preferidos pueden ser monoclonales.

La presente invención se refiere, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en particular TCR solubles (TCRs), acordes con la presente invención y/o con los complejos péptido-MHC de la misma, y métodos para sintetizarlos.

La presente invención se refiere, además, a anticuerpos o a otras moléculas de unión que reconozcan los péptidos acordes con la invención y/o con los complejos péptido-MHC de la misma, y métodos para sintetizarlos.

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

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

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

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

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

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

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con la SEQ ID N.º 255, conforme con la presente invención con la molécula MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de

Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

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

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

Cada soporte se puede conjugar con una segunda molécula activa, como por ejemplo IL-21, anti-CD3 o anti-CD28. Los soportes polipeptídicos aparecen descritos, por ejemplo, en el apartado de antecedentes de WO2014/071978A1, y en las referencias citadas en ella.

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

La presente invención se refiere, además, a un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, el cual comprende la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de los linfocitos T con moléculas MHC de clase I o II humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno al menos un péptido conforme a la presente invención. La presente invención se refiere, además, a un método en que dicho antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 255, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa 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 invención,

comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T conforme a la presente invención.

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

La presente invención concierne, además, al uso conforme a la presente invención, en que dicho medicamento es una vacuna, una célula, una población de células, como por ejemplo, una estirpe celular, TCR solubles y anticuerpos monoclonales.

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 que dichas células cancerosas son células de carcinoma hepatocelular (CHC).

La presente invención se refiere, además, a proteínas marcadoras y a biomarcadores concretos basados en los péptidos conformes a la presente invención que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del CHC.

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

Además, la presente invención se refiere a un método para producir una vacuna personalizada contra el cáncer para un paciente en concreto mediante una base de datos (también designada en la presente memoria como «archivo») de péptidos asociados a tumores preseleccionados.

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

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y de destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12 o 13, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos de la invención) pueden tener hasta 14, 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 típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, como por ejemplo, sales de cloruro o

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

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

El término «los péptidos de la presente invención» incluirá los péptidos que consisten o comprenden un péptido tal y como se ha definido antes según las SEQ ID N.º 255.

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

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

Un «epítopo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos.

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

Tabla 6: Frecuencias de expresión F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y los serotipos más frecuentes del HLA-DR. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$ (Mori M, et al. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):1017-27). Las combinaciones de A*02 o A*24 con determinados alelos HLA-DR podrían ser más o menos abundantes de lo esperado a partir de sus frecuencias aisladas debido al desequilibrio de ligamiento. Para más detalles véase Chanock y cols. (S. J. Chanock, et al (2004) HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and DRB1 in an African American population from Bethesda, USA Human Immunology, 65: 1223-1235).

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*02	Caucásica (América del Norte)	49,1%
A*02	Afroamericana (América del Norte)	34,1%
A*02	Asioamericana (América del Norte)	43,2%
A*02	Latinoamericana (América del Norte)	48,3%
DR1	Caucásica (América del Norte)	19,4%

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
DR2	Caucásica (América del Norte)	28,2%
DR3	Caucásica (América del Norte)	20,6%
DR4	Caucásica (América del Norte)	30,7%
DR5	Caucásica (América del Norte)	23,3%
DR6	Caucásica (América del Norte)	26,7%
DR7	Caucásica (América del Norte)	24,8%
DR8	Caucásica (América del Norte)	5,7%
DR9	Caucásica (América del Norte)	2,1%
DR1	Afroamericana (América del Norte)	13,20%
DR2	Afroamericana (América del Norte)	29,80%
DR3	Afroamericana (América del Norte)	24,80%
DR4	Afroamericana (América del Norte)	11,10%
DR5	Afroamericana (América del Norte)	31,10%
DR6	Afroamericana (América del Norte)	33,70%
DR7	Afroamericana (América del Norte)	19,20%
DR8	Afroamericana (América del Norte)	12,10%
DR9	Afroamericana (América del Norte)	5,80%
DR1	Asioamericana (América del Norte)	6,80%
DR2	Asioamericana (América del Norte)	33,80%
DR3	Asioamericana (América del Norte)	9,20%
DR4	Asioamericana (América del Norte)	28,60%
DR5	Asioamericana (América del Norte)	30,00%
DR6	Asioamericana (América del Norte)	25,10%
DR7	Asioamericana (América del Norte)	13,40%
DR8	Asioamericana (América del Norte)	12,70%
DR9	Asioamericana (América del Norte)	18,60%
DR1	Latinoamericana (América del Norte)	15,30%
DR2	Latinoamericana (América del Norte)	21,20%
DR3	Latinoamericana (América del Norte)	15,20%
DR4	Latinoamericana (América del Norte)	36,80%
DR5	Latinoamericana (América del Norte)	20,00%
DR6	Latinoamericana (América del Norte)	31,10%
DR7	Latinoamericana (América del Norte)	20,20%
DR8	Latinoamericana (América del Norte)	18,60%
DR9	Latinoamericana (América del Norte)	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	América del Sur	20%
A*24	Europa	18%

Los péptidos de la invención, preferiblemente cuando figuren incluidos en una vacuna de la invención tal y como se describe en la presente memoria, se unirán a A*02 o a A*24. Una vacuna también podría incluir péptidos que se unan a cualquier MHC de clase II. Por consiguiente, la vacuna de la invención puede ser usada para tratar el cáncer en pacientes que sean A*02 positivos, A*24 positivos o bien positivos para A*02 y para A*24, mientras que la no selección para los alotipos de MHC de clase II es necesaria debido a la naturaleza panunionista de esos péptidos.

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

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ADN incluye tanto ADN monocatenario como 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 derivar de un gen no mutado («normal»), mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos conforme a la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del

0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada.

El término «fragmento activo» define un fragmento, normalmente un péptido, polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos, que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunogénica) cuando se administra −solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado o en un vector− a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

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

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

Identidad porcentual = 100 [1 -(C/R)]

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

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

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

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

(IV) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

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

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

Los péptidos originales (sin modificar) descritos aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Preferentemente tales sustituciones estarían situadas al final de la cadena de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, si un aminoácido es reemplazado por un aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrófobo que es sustituido por otro aminoácido hidrófobo. 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 y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).

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

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los presentes en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados como sustitutos para producir polipéptidos inmunógenos e inmunogénicos de acuerdo con la presente descripción.

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.

A continuación en la Tabla 7 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/extensión pueden ser los péptidos de la secuencia original de la proteína o cualquier otro aminoácido(s). 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 linfocitos T específicos para un péptido acorde con la presente invención se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, preferiblemente como máximo de alrededor de 1 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 linfocitos T 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 cuatro residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.

Las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas y presentan péptidos derivados de la escisión proteolítica principalmente de proteínas endógenas, citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía.

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

uno de los fines de la presente invención consiste en proveer composiciones de péptidos que contengan péptidos de unión a complejos MHC de cualquiera de las 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 carcinoma hepatocelular (CHC) en particular. Existe igualmente la necesidad de identificar factores que puedan ser utilizados para el tratamiento contra el cáncer en general y contra el CHC en particular.

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

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

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej. células de CHC 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 (véase el Ejemplo 3). 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 ácidos nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante). Cabe esperar que la respuesta inmunitaria generada por esa vacunación terapéutica sea muy específica contra las células tumorales porque los tejidos normales no contienen los péptidos diana de la presente invención en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

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

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo $–NH_2$ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales

ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej. ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

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

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

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

La detección de los péptidos en una muestra de tejido enfermo puede ayudar a decidir si los tratamientos que implican al sistema inmunitario pueden ser beneficiosos, sobre todo si se sabe o se prevé que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de

acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo conocido con el que las células infectadas o cancerosas logran eludir la vigilancia del sistema inmunitario. Así pues, la presencia de los péptidos indica que dicho mecanismo no es utilizado por las células analizadas.

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

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

Por tanto, existe otro aspecto de la invención que proporciona un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: inmunizar un mamífero no humano

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

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

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

conocer en WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en Cohen CJ, et al. 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, et al. 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, et al. 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 (TCRs) 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 una 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, et al. Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. Protein Eng 2003 Sep;16(9):707-711.; Card KF, 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, 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, por ejemplo, US 2013/0115191), dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en las células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia a un receptor. Se puede encontrar más información en WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. Se describe una combinación de TCRs en WO 2012/056407A1. Otros métodos de producción se revelan en WO 2013/057586A1.

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

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 consolidar después en una puntuación de sobrepresentación calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (J. Pinheiro, et al. The nlme Package: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. 2007) 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 sus secuencias se identificaron 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 CHC (N = 16

muestras A*02-positivas que incluyeron trece muestras A*02:01-positivas, N = 15 muestras A*24-positivas) con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación natural de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de 31 pacientes con CHC.

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 la identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

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

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

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos tumorales de CHC y normales se cuantificaron con el 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 a un péptido que comprende una secuencia de la SEQ ID N.º 255, o a una variante de la misma que es al menos un 90% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 255 o una variante de la misma que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, en que dicho péptido no es un polipéptido entero subyacente.

La presente invención se refiere además a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 255 o a una variante de la misma que es al menos un 90% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 255, en que dicho péptido o variante tiene una longitud total de 8 a 100, preferiblemente de 8 a 30, y más preferiblemente de 8 a 14 aminoácidos.

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

La presente invención se refiere además a los péptidos acordes con la presente invención en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 255.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere además al método acorde con la invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 255, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

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

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

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

La presente invención se refiere, además, a proteínas marcadoras y biomarcadores concretos basados en los péptidos conformes a la presente invención, aquí denominadas «dianas» que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del carcinoma

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

El término «anticuerpo» o «anticuerpos» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas o «enteras», el término «anticuerpos» también incluye los fragmentos (p. ej. fragmentos CDRs, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las mismas, siempre que exhiban alguna de las propiedades deseadas (p. ej. , unión específica de un polipéptido marcador del CHC, liberación de una toxina en una célula de CHC que exprese un gen marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del CHC) 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 generar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto los polipéptidos marcadores del CHC enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la invención se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural o se puede producir con técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un ADNc que codifique un péptido acorde con la presente invención, como un péptido acorde con la SEQ ID N.º 255, o una variante o fragmento del mismo, 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 la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador del CHC 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, inmunotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.

El término «anticuerpo monoclonal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población notablemente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posiblemente naturales que pueden estar presentes en pequeño número. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (N.º pat. de EE. UU. 4. 816. 567, que se incorpora a la presente memoria íntegramente).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que estimula a los linfocitos para que produzcan

o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Otra alternativa consiste en inmunizar los linfocitos *in vitro*.

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

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

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la 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 quiméricos 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 hidrófobos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, p. ej. películas, liposomas o micropartículas. Para las personas versadas en la técnica será evidente que son preferibles ciertos vehículos dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se va a administrar.

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

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

Puesto que los péptidos como los mencionados en las Tablas de las páginas anteriores de la invención y por tanto sus polipéptidos subyacentes se expresan notablemente en el CHC, y se expresan en niveles extremadamente bajos en las células normales, la inhibición de una proteína seleccionada entre el grupo consistente en productos proteicos de los genes siguientes: Preferentemente para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR contra GLUL, GPAM, PLIN2,SLC16A1,SLC9A3R1, PCBD1, SEC16A, AKR1C4, ABCB11, HAL, CYP2E1, C4A, C4B, ALDH1L1, CRP, ACSL4, EEF2, HLTF, FBXO22,

GALK1, TMCO1, TMEM33, ZNF318, IPO9, AMACR, C1QTNF3, CYP4F8, CYP4F3, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, MOCOS, A1CF, COL18A1, HPR, LBP, C19orf80, CFHR5, ITIH4, TMEM110, LARP4, LMF2, SLC10A5, y SLC16A11; más preferentemente aún para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR contra ANKFY1, C12orf44, C16orf58, CPSF1, DCAF8, PEX19, DDX11, DDX12P, DECR2, NME4, DENND5B,DYM, EDC4, ERI3, FAM20A, FNDC3A,GPR107, GYG2, HEATR2, IFT81, KCTD3,SHKBP1, KIAA1324L, KLHL24, MARCH6, MBTPS2, MIR1279, CPSF6, NOC4L, NXF1, PANK2, PCNXL3, PIPSL, PSMD4, PSMD14, SLC35B1, TCP11L2, THNSL2, THOC2, TOMM5, TRAPPC6B, TRIM54, TRIM55, TRIM63, UGGT2, URB1, VPS54, WIZ, ZNF451, RFTN2, SCFD1, SERINC5, CCT7P2, CMAS, ANKS1A, C17orf70, CCT7, CDK5RAP2, CLPTM1; y preferentemente sobre todo para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR contra APOB, FASN, y/o COPA; y la expresión o la actividad de esos marcadores puede ser integrada preferiblemente en una estrategia terapéutica, p. ej. para el tratamiento o la prevención del CHC.

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 la 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 tal forma que puedan 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/diana del CHC con terapia génica antisentido se puede lograr con la administración directa de ARN antisentido del marcador tumoral 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 continuación.

Otra estrategia alternativa para inhibir la función de una proteína seleccionada del grupo constituido por las susodichas proteínas, y preferentemente de APOB, FASN y/o COPA, consiste en el uso de un ácido nucleico (p. ej. ARNsi, o un ácido nucleico que codifique un anticuerpo antiproteína o una porción del mismo, que pueda ser transferido a células cancerosas u otras células que acaben expresando en su interior el anticuerpo y segregándolo), una proteína o una molécula pequeña, o cualquier otro compuesto que tenga como blanco la expresión, la traducción y/o la función biológica de esta proteína.

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 ser incorporados a un vector en forma de ADN desnudo o de ácidos nucleicos para suministrar los ácidos nucleicos a las células con los que inhibir la expresión de la proteína marcadora del CHC. 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, Maryland, EE. UU.), Superfect (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y Transfectam (Promega Biotec, Inc., Madison,

Wisconsin, 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, California, 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 puede ser usado para infectar y así inocular el ácido nucleico antisentido a las células infectadas que inhiba la expresión de una proteína seleccionada entre el grupo consistente en las proteínas antes mencionadas. 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 radionúclido (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, 3H, ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (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 espectroscopía; radioscopia, tomografía computadorizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas

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

Tal y como se ha dicho antes, la presente invención se refiere por tanto a un péptido que comprende una secuencia de la SEQ ID N.º 255 o una variante de la misma que es un 90% homóloga a la SEQ ID N.º 255, o a una variante de la misma que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido. Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o, en el caso de las versiones alargadas de dichos péptidos, a una molécula de la clase II.

En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX 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 L, et al. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Jul 17;98(15):8809-14; Zaremba S, et al. Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. Cancer Res. 1997 Oct 15;57(20): 4570-7; Colombetti S, et al. Impact of orthologous melan-A peptide immunizations on the anti-self melan-A/HLA-A2 T cell cross-reactivity. J Immunol. 2006 Jun 1;176(11):6560-7; Appay V, et al. Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. Eur J Immunol. 2006 Jul;36(7):1805-14).

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 indicada en la SEQ ID N.º 255. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de linfocitos T activados.

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía (Godkin A, et al. Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3. 2). Int Immunol. 1997 Jun;9(6):905-11) y de las bases de datos científicas (Rammensee H. et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999 Nov;50(3-4):213-9), 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 la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 255, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y será capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unión a moléculas MHC de clase I o II. Las variantes de la presente invención conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y matar a las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos 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.

Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el TCR 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.

También pueden ser adecuados péptidos más largos. También es posible que los epítopos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyan el epítopo real. 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 22 aminoácidos.

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

En una forma de realización preferida de la invención el péptido consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 255.

«Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a la SEQ ID N.º 255 o una variante de la misma contiene segmentos adicionales de aminoácidos localizados en los extremos N- y/o C-terminal que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un 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 parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo “Ii”) tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497. En otras fusiones, los péptidos de la presente invención se pueden fusionar con un anticuerpo tal y como se describe en la presente memoria, o con una parte funcional del mismo, en particular integrándolo en la secuencia

del anticuerpo, para que vayan dirigidos específicamente por dicho anticuerpo, o por ejemplo, con un anticuerpo que es específico para las células dendríticas tal y como se describe en la presente memoria.

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

En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos por Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, y que se incorporan en la presente memoria como referencia. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH2-NH, -CH2S-, -CH2CH2-, -CH=CH-, -COCH2-, -CH(OH)CH2- y -CH2SO-. La patente de EE. UU. 4. 897. 445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH_2-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de $NaCNBH_3$.

Péptidos que comprenden las secuencias descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos

hidrófobos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej. el grupo hidrófobo t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

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

De manera similar, un péptido o variante de la invención puede ser modificado químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005, que se incorpora en la presente memoria como referencia. La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido perfórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

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

La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro. El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico. Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los residuos de lisina y otros grupos 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 terapéuticas y péptidos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que la unión por entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos con fines de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamilación con cianato potásico.

Un péptido o variante que está modificado o que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contiene enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestran Lukas et al. (Solid-phase peptide synthesis under continuous-flow conditions. Proc Natl Acad Sci USA. May 1981; 78(5): 2791–2795) y las referencias citadas 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 el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en el de 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 (Nottingham, Reino Unido).

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

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

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

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

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

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

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen Saiki RK, et al. (Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med. 1988 Sep 1;319(9):537-41). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

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

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

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

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

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

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

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

La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva de la proteína muy elevados, de hasta 1 mg/l en células COS. En estirpes celulares menos potentes los niveles de proteínas suelen rondar ~0,1

mg/l. La presencia del origen de replicación del SV40 genera niveles elevados de replicación del ADN en células COS que toleran la replicación del SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden contener el origen pMB1 (derivado del pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen de la beta-lactamasa para la selección por resistencia a la ampicilina, hGH poliA, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la preprotripsina (PPT) pueden canalizar la secreción de las proteínas de fusión FLAG hacia el medio de cultivo, donde se pueden purificar por medio de anticuerpos anti-FLAG, resinas y placas. En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

En otra forma de realización dos o más péptidos o variantes peptídicas de la invención se codifican y se expresan en orden sucesivo (similar a constructos de «collar de cuentas»). Al hacerlo, los péptidos o los variantes peptídicas se pueden enlazar o fusionar juntas mediante segmentos de aminoácidos enlazantes, como por ejemplo LLLLLL, o se pueden unir sin ningún otro péptido adicional entre ellos. Estos constructos también pueden ser utilizados para la terapia contra el cáncer, y podrían inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE. UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (N.º ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general 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 transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

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

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

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene ácido prostático fosfatasa (PAP) fueron aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) de EE. UU. el 29 de abril de 2010 para el tratamiento del cáncer de próstata hormonorrefractario metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel–T) (Small EJ, et al. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. J Clin Oncol. 2006 Jul 1;24(19):3089-94. Rini et al. 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. 2006 Jul 1;107(1):67-74).

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

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

la inyección del ADN incluyen i. d. , i. m. , s. c. , i. p. e i. v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter et al 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 por tiempo suficiente para activar los linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo el antígeno un péptido conforme a la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

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

La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE.UU. con el N.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila Schneider line 2* está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Karre et al 1985. (Ljunggren, H. -G., and K. Karre. 1985. J. Exp. Med. 162:1745).

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.

De forma similar, si se utiliza como antígeno un epítopo de MHC de clase I, los linfocitos T serán linfocitos T 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 la SEQ ID N.º 255, o una secuencia de aminoácidos variante de la misma.

Existen otros métodos para generar linfocitos T *in vitro*. Por ejemplo, emplear linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al. (Induction of peptide-specific primary cytotoxic T lymphocyte responses from human peripheral blood. Eur J Immunol. 1995 Jun;25(6):1783-7) recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de linfocitos T. Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter et al. 2003 (Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J Immunol. 2003 Nov 15;171(10):4974-8) describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En la presente invención, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite desencadenar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidez alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben

incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad co-estimuladora como anticuerpos anti-CD28. Tales sistemas de aAPC también precisan a menudo el concurso de factores solubles adecuados, por ejemplo citocinas, como la interleucina-12.

Para la preparación de linfocitos T también se pueden utilizar células alogénicas; en WO 97/26328 se describe detalladamente un método que se incorpora a la presente memoria como referencia. Por ejemplo, además de células de *Drosophila* y de células T2, para presentar antígenos se pueden usar otras células tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras, células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo se pueden utilizar virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta et al. (1994) Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. Virology. 1994 Aug 1;202(2):949-55), que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).

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

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255.

Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interaccionando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo uniéndosele. Los linfocitos T son útiles en un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención y al cual se le administre un número eficaz de linfocitos T activados. Los linfocitos T que se le administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser linfocitos T autólogos. Otra alternativa consiste en que los linfocitos

T no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que dicho individuo esté sano. Por «individuo sano» los inventores entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que pueda detectarse mediante análisis.

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

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

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

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

Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos. Se pueden encontrar revisiones en: Gattinoni L, et al. Adoptive

immunotherapy for cancer: building on success. Nat Rev Immunol. 2006 May;6(5):383-93. Review. y Morgan RA, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science. 2006 Oct 6;314(5796):126-9).

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

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

estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítopos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 255 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

En otro aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 255, y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Se puede consultar una perspectiva general en, por ejemplo (Pascolo et al., Human peripheral blood mononuclear cells transfected with messenger RNA stimulate antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes in vitro. Cell Mol Life Sci. 2005 Aug;62(15):1755-62). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que

contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un 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 linfocitos T CD8-positivos y linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870. 893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de 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 The Yin and Yang of T cell costimulation. Science 1995 Nov 10;270(5238):932-3). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se las ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta

convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE. UU. N.º 5. 849. 589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich, 1996 Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells Nat Med. 1996 Oct;2(10):1096-103).

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

inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej. , AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, 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. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

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

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

En una forma de realización preferida la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores

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

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, sabores, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed., 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2112253, por ejemplo.

La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular del carcinoma hepatocelular (CHC) y de otras neoplasias malignas.

La presente invención también contempla un equipo que comprende:

(a) un envase con una composición farmacéutica como la descrita más arriba, en forma de solución o liofilizada;

(b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y

(c) opcionalmente, (I) instrucciones de uso de la solución o (II) de la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

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

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

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

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

Los equipos de la presente invención pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención,

acompañado o no de otros componentes (p. ej. , otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.

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

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

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

Puesto que los péptidos de la invención proceden de tejido tumoral relacionado con el CHC, el medicamento de la invención debe ser utilizado preferentemente para tratar el CHC.

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

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

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

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

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

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

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

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

Es importante tener presente que la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna conforme a la invención ataca el cáncer en diferentes estadios celulares y en diferentes estadios de desarrollo. Además se atacan diferentes vías de señalización relacionadas con el cáncer. Esto supone una ventaja con respecto a las vacunas que solo van dirigidas contra una o pocas dianas, que pueden permitir que el tumor se adapte con facilidad al ataque (evasión tumoral). Además, no todos los tumores expresan el mismo patrón de antígenos, por lo que la combinación de varios péptidos asociados a tumor asegura que el tumor en cuestión contenga al menos alguna de las dianas. La composición ha sido diseñado específicamente de modo tal que se espera que todo aquel tumor que sea positivo para HLA-A*02 y/o HLA-A*24 exprese varios de los antígenos y abarque varias vías independientes necesarias para el crecimiento y el mantenimiento del tumor. A la vista de los análisis experimentales que lo sustentan esto parece estar asegurado para cada uno de los subgrupos de péptidos específicos de los dos alelos HLA de clase I (A*02 y A*24). Así pues, la vacuna puede ser utilizada con facilidad sin atender a las indicaciones recogidas en la ficha técnica (*off-the-shelf*) para una población de pacientes más amplia. Esto significa que no será preciso ninguna otra evaluación de biomarcadores de la expresión de los antígenos aparte del tipado del HLA para seleccionar a los pacientes que acabarán siendo tratados con la vacuna, pero que, aun así, está asegurado que la respuesta inmunitaria estimulada atacará simultáneamente a varias dianas, lo que es importante para la eficacia (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

En otro aspecto, los péptidos son preseleccionados por su inmunogenicidad antes de ser incluidos en el archivo. A modo de ejemplo y sin ánimo de limitación, la inmunogenicidad

de los péptidos incluidos en el archivo se determina con un método que comprende la estimulación reiterada *in vitro* de linfocitos T CD8+ de donantes sanos con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con los complejos de péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28.

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

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

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

Preferentemente, los péptidos incluidos en la vacuna se identificarán con el método consistente en:(a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión; (b) comparación de los péptidos identificados con (a) un archivo (base de datos) de péptidos como el descrito antes; y (c) selección de al menos un péptido de la base de datos que presente correlación con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente. Por ejemplo, los TUMAP

presentados por la muestra del tumor se identifican mediante:(a1) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal del mismo tipo de tejido de la muestra tumoral para identificar proteínas que se sobreexpresen o se expresen de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Preferentemente, las secuencias de los ligandos MHC se identifican eluyendo los péptidos unidos de las moléculas MHC aisladas de la muestra tumoral y secuenciando los ligandos eluidos. Preferentemente, la muestra tumoral y el tejido normal se obtienen del mismo paciente.

Además, o como alternativa, a la selección de péptidos con el modelo del archivo (base de datos), los TUMAP también se pueden identificar en el paciente *de novo* e incluirse después en la vacuna. A modo de ejemplo, los TUMAP candidatos se pueden identificar en el paciente mediante (a) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal que corresponde al tipo de tejido de la muestra del tumor para identificar proteínas que se sobreexpresan o se expresan de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Como otro ejemplo, se pueden identificar proteínas portadoras de mutaciones que sean exclusivas de la muestra tumoral en comparación con el correspondiente tejido normal del paciente, así como encontrar TUMAP que permitan reconocer específicamente la mutación. Por ejemplo, el genoma del tumor y el del tejido normal correspondiente se pueden secuenciar mediante secuenciación hologenómica: Para descubrir mutaciones que no sean sinónimas en las regiones codificadoras de las proteínas de los genes, se extraen el ADN y el ARN genómicos de tejidos tumorales y el ADN genómico germinal normal y no mutado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La estrategia de secuenciación de nueva generación (NGS) aplicada queda limitada a la re-secuenciación

de las regiones codificantes de proteínas (re-secuenciación del exoma). Con este objeto, se captura el ADN exónico de muestras humanas con equipos de enriquecimiento dirigido suministrados por el proveedor y se procede a la secuenciación con p. ej. , un secuenciador HiSeq2000 (Illumina). Además, se secuencia el ARNm del tumor para determinar la cuantificación directa de la expresión génica y la validación de que los genes mutados se expresan en los tumores del paciente. Los millones de lecturas de secuencia resultantes se procesan con algoritmos informáticos. La lista de resultados contiene mutaciones y la expresión génica. Las mutaciones somáticas específicas del tumor se determinan comparándolas con las variaciones germinales derivadas de las PBMC y se priorizan. Los péptidos identificados *de novo* pueden ser analizados para determinar su inmunogenicidad según lo descrito antes con el archivo, y los TUMAP candidatos que posean la inmunogenicidad adecuada se escogen para la inclusión en la vacuna.

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

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

Una vez escogidos los péptidos para la vacuna basada en péptidos personalizados, se fabrica la vacuna. La vacuna preferentemente es una formulación líquida que contiene los péptidos disueltos en DMSO al 33%.

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

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

A continuación 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 como referencia en su integridad.

La presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255. Los ejemplos se refieren además a las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 254, y de la SEQ ID N.º 256 a la SEQ ID N.º 300 como ejemplos de referencia.

En las Figuras:

La Figura 1 muestra la sobrepresentación de varios péptidos en tejidos normales (gris oscuro) y en el CHC (gris claro). Figura 1A) APOB, Péptido: ALVDTLKFV (A*02) (SEQ ID N.º 7), tejidos de izquierda a derecha; 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 16 riñones, 4 muestras de leucocitos, 45 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 1 membrana serosa, 3 pieles, 4 bazos, 7 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 20 hígados; Figura 1B) ALDH1L1, Péptido: KLQAGTVFV (A*02) (SEQ ID N.º 2), tejidos de izquierda a derecha:1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 16 riñones, 4 leucocitos, 45 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 1 membrana serosa, 3 pieles, 4 bazos, 7 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas y 20 hígados; Figura 1C) C8B, Péptido: AYLLQPSQF (A*242 glándulas suprarrenales, 1 arteria, 4 cerebros, 1 mama, 5 colones, 1 corazón, 13 riñones, 9 pulmones, 3 páncreas, 2 rectos, 3 pieles, 1 bazo, 12 estómagos, 1 timo, 2 úteros y 9 hígados; Figura 1D) RAD23B, Péptido: KIDEKNFVV (SEQ ID N.º 63) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófagos; Figura 1E) RAD23B, Péptido: KIDEKNFVV (SEQ ID N.º 63), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 5 estirpes celulares, 1 tejido normal (1 glándula suprarrenal), 16 tejidos cancerosos (2 cánceres cerebrales, 4 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de recto, 1 cáncer de vejiga urinaria, 3 cánceres de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1F) RFNGRLPPDTLLQQV (SEQ ID N.º 92), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones,

2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófagos; Figura 1G) RFNG, Péptido: RLPPDTLLQQV (SEQ ID N.º 92), solo se exponen las muestras en que ha habido presentación del péptido: 2 estirpes celulares, 2 tejidos normales (2 glándulas suprarrenales), 17 tejidos cancerosos (1 cáncer cerebral, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de esófago, 5 cánceres hepáticos, 4 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de próstata, 2 cánceres de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1H) FLVCR1, Péptido: SVWFGPKEV (SEQ ID N.º 104) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófagos; Figura 1I) FLVCR1, Péptido: SVWFGPKEV (SEQ ID N.º 104), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 9 estirpes celulares, 1 tejido normal (1 intestino delgado), 16 tejidos cancerosos (1 cáncer cerebral, 1 cáncer de mama, 5 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de piel, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1J) IKBKAP, Péptido: LLFPHPVNQV (SEQ ID N.º 156) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófago; Figura 1K) IKBKAP, Péptido: LLFPHPVNQV (SEQ ID N.º 156), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 7 estirpes celulares, 2 cultivos primarios, 1 tejido normal (1 colon), 34 tejidos cancerosos (1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 2 cánceres de esófago, 2 leucemias leucocíticas, 4 cánceres hepáticos, 11

cánceres de pulmón, 3 cánceres de ganglio linfático, 5 cánceres de ovario, 4 cánceres de vejiga urinaria) (de izquierda a derecha); Figura 1L) NKD1, Péptido: FLDTPIAKV (SEQ ID N.º 47), 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófago; Figura 1M) NKD1, Péptido: FLDTPIAKV (SEQ ID N.º 47), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 1 de otra enfermedad (encefalocele), 2 tejidos normales (1 pulmón, 1 bazo), 35 tejidos cancerosos (5 cánceres cerebrales, 6 cánceres de colon, 1 cánceres de esófago, 6 cánceres hepáticos, 9 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de próstata, 4 cánceres de recto, 2 cánceres de estómago) (de izquierda a derecha).

La Figura 2 muestra perfiles de expresión a modo de ejemplo (expresión relativa comparada con el riñón normal) de genes originarios de la presente invención que están fuertemente sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el CHC en un conjunto de tejidos normales (gris oscuro) y de 12 muestras de CHC (gris). Figura 2A) APOB, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2B) AMACR, tejidos de izquierda a derecha:1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2C) ALDH1L1, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1

ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2D) FGG, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2E) C8B, tejidos de izquierda a derecha:1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; y Figura F) HSD17B6, tejidos de izquierda a derecha:1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero y 1 vena.

La Figura 3 muestra a título de ejemplo resultados de la citometría de flujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido. Véanse más explicaciones en el ejemplo 4.

La Figura 4 muestra a título de ejemplo resultados de la citometría de lujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido. Véanse más explicaciones en el ejemplo 4.

EJEMPLOS

La presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255. Los ejemplos se refieren además a las secuencias

de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 254, y SEQ ID N.º 254 a SEQ ID N.º 300 como ejemplos de referencia.

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes procedían de la Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Tübinga, Alemania; Istituto Nazionale Tumori "Pascale". Struttura Complessa Biologia Molecolare e Oncogenesi Virale, Via Mariano, Nápoles, Italia; Bio-Options Inc., Brea, California, EE. UU; ProteoGenex Inc., Culver City, California, EE. UU.; Asterand Europe, Royston Herts, Reino Unido. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extirpación y permanecieron a -70 ºC o una temperatura inferior 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 et al., 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.

Análisis por espectrometría de masas

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema nanoAcquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 1,7 µm (Waters) aplicando un caudal de 400

nl por minuto. Posteriormente los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos fases con 10% al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente nano-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). Los espectrómetros de masas LTQ-Orbitrap se hicieron funcionar en el modo dependiente de datos con el método TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el orbitrap (R = 30 000), al que siguieron barridos EM/EM también en el orbitrap (R = 7500) con los 5 iones precursores más abundantes y exclusión dinámica de los iones preseleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia.

La cuantificación relativa por CL-EM sin marcaje se efectuó con recuento iónico, es decir, mediante la extracción y el análisis de las características mostradas por la CL-EM (Mueller et al. 2007a). El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron además con deconvolución del estado de carga y alineamiento del tiempo de retención (Mueller et al. 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 variación entre los duplicados técnicos y biológicos. De ese modo, cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo, todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra así como las variaciones de los duplicados. El perfil superpone muestras de CHC con muestras de tejido normal de referencia.

En la Figura 1 se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrerrepresentados a modo de ejemplo.

Los niveles de presentación de los péptidos indicados a título de ejemplo se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8:Grados de presentación. La tabla enumera los péptidos que en los tumores aparecen sobrepresentados en diversos grados con respecto a un grupo de tejidos normales: Muchísimo (+++), mucho (++) y más (+). S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	+++
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++
6	KLSPTVVGL	+++
7	ALVDTLKFV	+++
8	KLLEEATISV	+
9	ALANQKLYSV	+
10	SLLEEFDFHV	+++
11	SLSQELVGV	+
12	FLAELAYDL	+++
14	ALADLTGTVV	+++
15	LLYGHTVTV	+
16	SLLGGNIRL	++
17	RVAS*PTSGV	+
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
22	RIAGIRGIQGV	+++
23	RLYDPASGTISL	+
24	SLAEEKLQASV	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
26	SLLHTIYEV	+++
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLNSL	+++

29	YIQDEINTI	+++
30	YLGEGPRMV	++
31	YQMDIQQEL	++
32	ALNAVRLLV	+++
33	LLHGHIVEL	+
34	SLAEGTATV	+++
38	ALADVVHEA	+
39	ALDPKANFST	+++
40	ALLAEGITWV	+
42	ALLGGNVRMML	+++
44	ALQDAIRQL	+
47	FLDTPIAKV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
51	GLAEELVRA	+
52	GLFNAELLEA	+
53	GLIHLEGDTV	+++
54	GLLDPNVKSIFV	+++
55	GLYGRTIEL	+
56	GVLPGLVGV	+
57	HLTEAIQYV	++
58	ILADLNLSV	+
59	ILADTFIGV	++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	++
66	KLHEEIDRV	++
67	KLKETIQKL	+++
70	KLLDLETERILL	++
71	KLLDNWDSV	+++
72	KLSEAVTSV	+
75	KQMEPLHAV	+
76	LLADIGGDPFAA	+++
77	LLHEENFSV	+
79	LLLSTGYEA	+++
81	NLASFIEQVAV	++
82	NVFDGLVRV	+
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	+
86	RLAAFYSQV	+++
88	RLIDRIKTV	+++

89	RLIEEIKNV	+++
91	RLPDIPLRQV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+++
96	SLLEEPNVIRV	++
97	SLLPQLIEV	++
98	SLLSPEHLQYL	++
99	SLSAFLPSL	+++
101	SLWEGGVRGV	+++
103	SMGDHLWVA	+++
107	TLGQFYQEV	+++
108	TLLKKISEA	+++
109	TLYALSHAV	+
111	TVMDIDTSGTFNV	+
113	VLMDKLVEL	++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	+++
117	YAFPKSITV	+++
119	YLDKNLTVSV	+
120	YLGEEYVKA	+++
121	YLITGNLEKL	+
122	YLSQAADGAKVL	+++
123	YLWDLDHGFAGV	++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	++
127	VLIGSNHSL	+
128	GLAFSLNGV	+
129	SQADVIPAV	+
130	ALDAGAVYTL	++
131	ALDSGAFQSV	++
132	ALHEEVVGV	+
133	ALLEMDARL	+
134	ALLETNPYLL	++
135	ALLGKIEKV	+
137	ALPTVLVGV	++
139	ALSSKPAEV	+
142	AVIGGLIYV	++
144	FIQLITGV	+
146	FLWTEQAHTV	+
147	GLAPGGLAVV	+
148	GLFAPLVFL	+++

151	HLAKVTAEV	+
154	KLTDHLKYV	+
161	RLLDEQFAV	+
162	RLMSALTQV	++
163	RLTESVLYL	++
164	RMLIKLLEV	+
167	SLAESSFDV	++
168	SLAVLVPIV	+
169	SLFEWFHPL	+
170	SLHNGVIQL	+
171	SLIPAVLTV	+
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
174	TLAELGAVQV	+
176	TLGQIWDV	+
177	VLDEPYEKV	+
179	YIHNILYEV	++
180	YLGPHIASVTL	++
181	YLLEKFVAV	+
184	VVLDGGQIVTV	+
185	ALFPALRPGGFQA	++
186	VLLAQIIQV	+
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+
189	AFSPDSHYLLF	+++
190	RYNEKCFKL	+++
191	KYPDIISRI	++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+++
194	QYASRFVQL	+++
195	RYAPPPSFSEF	+++
196	AYLKWISQI	+++
197	RWPKKSAEF	+
198	LYWSHPRKF	+
200	AYLLQPSQF	+++
201	AYVNTFHNI	+++
202	AYGTYRSNF	+++
203	YYGILQEKI	+++
204	KYRLTYAYF	++
205	VYGLQRNLL	+
206	KWPETPLLL	+++

208	SYNPAENAVLL	++
210	AYPAIRYLL	++
211	IYIPSYFDF	++
212	VYGDVISNI	+++
213	YYNKVSTVF	+
214	IYVTSIEQI	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAIRQI	+
219	GVMAGDIYSV	+
220	SLLEKELESV	++
221	ALCEENMRGV	+
224	ALASVIKEL	+
225	KMDPVAYRV	+
226	AVLGPLGLQEV	+
227	ALLKVNQEL	+
228	YLITSVELL	++
229	KMFESFIESV	++
230	VLTEFTREV	+
231	RLFNDPVAMV	++
233	ALLGKLDAI	+
234	YLEPYLKEV	+
236	ALADKELLPSV	++
237	ALRGEIETV	+++
238	AMPPPPPQGV	++
239	FLLGFIPAKA	+
240	FLWERPTLLV	+++
241	FVLPLLGLHEA	++
242	GLFAPVHKV	+
243	GLLDNPELRV	+++
244	KIAELLENV	+
245	KLGAVFNQV	+
248	KLNDLIQRL	+
249	LLLGERVAL	+++
250	NLAEVVERV	++
251	RLFADILNDV	++
252	RTIEYLEEV	+
253	RVPPPPQSV	+
255	SLFGQDVKAV	+++
256	SLFQGVEFHYV	+
257	SLLEKAGPEL	+++
258	SLMGPVVHEV	+

260	TLMDMRLSQV	++
261	VLFQEALWHV	++
263	VLYPSLKEI	+
264	VMQDPEFLQSV	++
265	WLIEDGKVVTV	++
266	SLLESNKDLLL	+
267	ALNENINQV	+
268	KLYQEVEIASV	+
269	YLMEGSYNKV	+
270	SVLDQKILL	++
271	LLLDKLILL	+
272	QQLDSKFLEQV	+
273	AILETAPKEV	++
274	ALAEALKEV	+
275	ALIEGAGILL	++
276	ALLEADVNIKL	+
277	ALLEENSTPQL	+
278	ALTSVVVTL	+
279	ALWTGMHTI	+
281	GLLAGDRLVEV	+
282	GQFPSYLETV	++
283	ILSGIGVSQV	+
284	KLDAFVEGV	+
286	KVLDKVFRA	+
288	LLDDSLVSI	+
289	LLLEEGGLVQV	++
290	NLIDLDDLYV	++
292	RIPAYFVTV	+
293	FLASESLIKQI	++
295	SLFSSPPEI	++
297	TLFYSLREV	+
298	TMAKESSIIGV	++
299	ALLRVTPFI	+
301	VLADFGARV	+++
302	KIQEILTQV	+++
303	GVYDGEEHSV	+
304	SLIDQFFGV	+++
305	GVLENIFGV	+
308	ALLRTVVSV	+
309	GLIEIISNA	+
310	SLWGGDVVL	+

311	FLIPIYHQV	+
312	RLGIKPESV	+++
313	LTAPPEALLMV	+
314	YLAPFLRNV	+
315	KVLDGSPIEV	+
316	LLREKVEFL	+
317	KLPEKWESV	++
318	KLNEINEKI	+
319	KLFNEFIQL	+
320	GLADNTVIAKV	+
322	ILYDIPDIRL	+
324	RLFETKITQV	++
326	ALSDGVHKI	++
327	GLNEEIARV	++
328	RLEEDDGDVAM	+
329	SLIEDLILL	+++
330	SMSADVPLV	++
332	AMLAVLHTV	+
334	SILTIEDGIFEV	+
335	SLLPVDIRQYL	++
336	YLPTFFLTV	+
337	TLLAAEFLKQV	+
338	KLFDSDPITVTV	+++
340	KVFDEVIEV	+
342	AMSSKFFLV	+
343	LLLPDYYLV	+
345	SYNPLWLRI (A*24)	+++
346	LYQILQGIVF (A*24)	+++
347	ALNPADITV	+

EJEMPLO 2

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

La sobrepresentación o la presentación específica de un péptido en las células tumorales con respecto a las células normales es suficiente para que sea de utilidad en la inmunoterapia, y algunos péptidos son específicos de tumor aunque la proteína de la que proceden esté presente también en los tejidos normales. Además, la obtención de los perfiles de expresión del ARNm añade otro nivel de seguridad a la selección de las dianas

peptídicas para la inmunoterapia. Concretamente para las opciones terapéuticas sujetas a un alto riesgo de seguridad, como los TCR madurados por afinidad, el péptido diana ideal será todo aquel derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no se halle en los tejidos normales.

Fuentes de ARN y preparación

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

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

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

Experimentos con micromatrices

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2. 0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA

Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2. 0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2. 0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes 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 normal de riñón 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 que se expresan exclusivamente en el CHC. Los grados de expresión de otros genes mostrados a título de ejemplo se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9: Grados de expresión. La tabla enumera los péptidos derivados de genes que en los tumores aparecen sobrepresentados en diversos grados con respecto a un grupo de tejidos normales: Muchísimo (+++), mucho (++) y más (+).

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión génica
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	++
3	ILDDNMQKL	+
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++
7	ALVDTLKFV	+++
10	SLLEEFDFHV	+
13	GLIDTETAMKAV	+++
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
27	TLPDFRLPEI	+++

28	TLQDHLNSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
31	YQMDIQQEL	+++
38	ALADVVHEA	+
39	ALDPKANFST	+
41	ALLELDEPLVL	+++
42	ALLGGNVRMML	+
44	ALQDAIRQL	+
45	ALQDQLVLV	++
46	AMAEMKVVL	++
48	FLLEQPEIQV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
50	FTIPKLYQL	+++
52	GLFNAELLEA	+++
53	GLIHLEGDTV	+++
55	GLYGRTIEL	+++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	+
66	KLHEEIDRV	+++
67	KLKETIQKL	+++
68	KLLAATVLLL	+++
73	KLTLVIISV	+++
74	KLYDLELIV	+++
76	LLADIGGDPFAA	+
81	NLASFIEQVAV	+
82	NVFDGLVRV	+++
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	++
87	RLFEENDVNL	+++
90	RLLDVLAPLV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+
95	SICNGVPMV	++
97	SLLPQLIEV	+++
100	SLVGDIGNVNM	+++
103	SMGDHLWVA	+
105	SVYDGKLLI	+
106	TLAAIIHGA	++
107	TLGQFYQEV	+++

109	TLYALSHAV	+++
110	TVGGSEILFEV	+++
113	VLMDKLVEL	+++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	++
117	YAFPKSITV	+
119	YLDKNLTVSV	++
120	YLGEEYVKA	+++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	+++
129	SQADVIPAV	++
130	ALDAGAVYTL	++
132	ALHEEVVGV	++
141	AMGEKSFSV	+
142	AVIGGLIYV	+++
145	FLIAEYFEHV	++
146	FLWTEQAHTV	++
148	GLFAPLVFL	+
149	GLLSGLDIMEV	+++
154	KLTDHLKYV	+++
157	QLLPNLRAV	+
158	RIISGLVKV	++
160	RLLAKIICL	+++
163	RLTESVLYL	++
165	RVIEHVEQV	++
168	SLAVLVPIV	+++
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
175	TLFEHLPHI	++
177	VLDEPYEKV	++
182	YLLHFPMAL	+++
183	YLYNNEEQVGL	+++
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+
200	AYLLQPSQF	+++
204	KYRLTYAYF	+++
206	KWPETPLLL	+
215	IYTGNISSF	+++
217	DYIPYVFKL	+++

218	VYQGAIRQI	+++
228	YLITSVELL	+
233	ALLGKLDAI	+
249	LLLGERVAL	+
255	SLFGQDVKAV	+
259	TLITDGMRSV	+
263	VLYPSLKEI	+
273	AILETAPKEV	+
275	ALIEGAGILL	+
286	KVLDKVFRA	+
296	SLLSGRISTL	+
298	TMAKESSIIGV	+
301	VLADFGARV	++
302	KIQEILTQV	+
315	KVLDGSPIEV	++
318	KLNEINEKI	+++
320	GLADNTVIAKV	+
324	RLFETKITQV	++
327	GLNEEIARV	+
336	YLPTFFLTV	+
341	YLAIGIHEL	++
345	SYNPLWLRI (A*24)	++

EJEMPLO 3: Intercambio de ligandos por UV/Unión de péptidos a HLA-A*02 y HLA-A*24

Los péptidos candidatos para los tratamientos con linfocitos T acordes con la presente invención se sometieron a nuevos análisis para determinar su capacidad de unión a MHC (afinidad). Los diferentes complejos de péptido-MHC se produjeron con intercambio de ligandos por UV, técnica en la que un péptido sensible a los rayos UV se escinde tras exponerlo a dicha radiación y se intercambia por el péptido de interés que se pretende analizar. Sólo los candidatos peptídicos que pueden unirse y estabilizar las moléculas de MHC receptoras del péptido evitan la disociación de los complejos MHC. Para determinar el rendimiento de la reacción de intercambio se llevó a cabo un ELISA basado en la detección de la cadena liviana (β2m) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo siguiendo la descripción general de Rodenko y cols. (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 4 veces y se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con un tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Como patrones se emplearon monómeros HLA-A*0201/MLA-001 replegados, en el intervalo de 15 a 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC resultantes de la reacción de intercambio por UV se diluyeron a 1:100 con tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con anticuerpo anti-β2m conjugado con HRP 2 µg/ml durante 1 h a 37 °C, se lavaron de nuevo y se revelaron con solución de TMB que se detuvo con $NH2SO_4$. La absorción se midió a 450 nm. Los péptidos candidatos que presentan un rendimiento de intercambio elevado (preferentemente superior al 50% y más preferentemente superior al 70%) se prefieren en general para la generación y la producción de anticuerpos o de fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o de fragmentos funcionales de los mismos, ya que muestran la suficiente avidez hacia las moléculas MHC y evitan la disociación de los complejos MHC.

Tabla 10A: Niveles de unión a MHC de clase I

<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 %= +++; >= 75 % = ++++

SEQ ID	Código del péptido	Intercambio del péptido
12	GPC3-001	++++
5	APOB-001	++++
7	APOB-002	++++
1	APOB-003	++++
13	HSD11B1-001	++++
227	SAMM-001	++++
4	APOB-004	++++
232	MAPKAPK5-001	++++
10	USO-001	++++
304	USP14-001	++++
219	ADF-012	++++

223	IDI1-001	++++
224	IFT81-001	++++
14	NCST-001	++++
228	ACSL4-001	++++
230	IPO9-001	++++
15	SLC35B2-001	++++
16	ACSL3-001	++++
303	MAGEB2-001	+++
226	THT-001	+++
8	DYM-001	+++
6	AXIN2-001	+++
225	QAR-001	+++
2	ALDH1L1-001	+++
221	EEF2-001	+++
220	DRG2-001	+++
301	C1QTNF3-001	+++
11	ZNF318-001	+++

Tabla 10B: Niveles de unión a MHC de clase I

La unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I a HLA-A*02 o a HLA-A*24 según su secuencia peptídica se clasificó en función del rendimiento del intercambio del péptido: ≥10% = +; ≥20% = ++; ≥50 = +++; ≥ 75% = ++++. S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
1	VMAPFTMTI	"++++"
2	KLQAGTVFV	"+++"
3	ILDDNMQKL	"+++"
4	KLQDFSDQL	"++++"
5	ALVEQGFTV	"++++"
6	KLSPTVVGL	"+++"
7	ALVDTLKFV	"++++"
8	KLLEEATISV	"+++"
9	ALANQKLYSV	"+++"
10	SLLEEFDFHV	"++++"
11	SLSQELVGV	"+++"
12	FLAELAYDL	"++++"
13	GLIDTETAMKAV	"++++"
14	ALADLTGTVV	"++++"
15	LLYGHTVTV	"++++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
16	SLLGGNIRL	"++++"
17	RVAS*PTSGV	"+++"
18	ALYGKTEVV	"+++"
19	FLEETKATV	"+++"
20	KLSNVLQQV	"++++"
21	QLIEVSSPITL	"++++"
22	RIAGIRGIQGV	"++++"
23	RLYDPASGTISL	"+++"
24	SLAEEKLQASV	"+++"
25	SLDGKAALTEL	"+++"
26	SLLHTIYEV	"+++"
27	TLPDFRLPEI	"++++"
28	TLQDHLNSL	"+++"
29	YIQDEINTI	"+++"
30	YLGEGPRMV	"+++"
31	YQMDIQQEL	"+++"
32	ALNAVRLLV	"++++"
33	LLHGHIVEL	"+++"
34	SLAEGTATV	"+++"
35	SLQESILAQV	"+++"
36	ILNVDGLIGV	"+++"
37	LLLPLLPPLSP	"+++"
38	ALADVVHEA	"+++"
39	ALDPKANFST	"+++"
40	ALLAEGITWV	"+++"
41	ALLELDEPLVL	"++++"
42	ALLGGNVRMML	"+++"
43	ALLGVWTSV	"++"
44	ALQDAIRQL	"++++"
45	ALQDQLVLV	"++++"
46	AMAEMKVVL	"+++"
47	FLDTPIAKV	"++"
48	FLLEQPEIQV	"+++"
49	FLYPEKDEPT	"++"
50	FTIPKLYQL	"++"
51	GLAEELVRA	"++"
52	GLFNAELLEA	"+++"
53	GLIHLEGDTV	"+++"
54	GLLDPNVKSIFV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
55	GLYGRTIEL	"+++"
56	GVLPGLVGV	"+++"
57	HLTEAIQYV	"+++"
58	ILADLNLSV	"++++"
59	ILADTFIGV	"+++"
60	ILSPLSVAL	"++++"
61	KIADFELPTI	"++++"
62	KIAGTNAEV	"++"
63	KIDEKNFVV	"+++"
64	KILEETLYV	"+++"
65	KLFSGDELLEV	"+++"
66	KLHEEIDRV	"+++"
67	KLKETIQKL	"+++"
68	KLLAATVLLL	"++"
69	KLLDEVTYLEA	"++++"
70	KLLDLETERILL	"++++"
71	KLLDNWDSV	"++++"
72	KLSEAVTSV	"+++"
74	KLYDLELIV	"+++"
75	KQMEPLHAV	"++"
76	LLADIGGDPFAA	"+++"
77	LLHEENFSV	"+++"
78	LLIDDEYKV	"+++"
80	LLYEGKLTL	"++++"
81	NLASFIEQVAV	"+++"
82	NVFDGLVRV	"+++"
83	QLHDFVMSL	"++++"
84	QLTPVLVSV	"+++"
85	RILPKVLEV	"+++"
86	RLAAFYSQV	"+++"
87	RLFEENDVNL	"+++"
88	RLIDRIKTV	"++"
89	RLIEEIKNV	"++"
90	RLLDVLAPLV	"+++"
91	RLPDIPLRQV	"+++"
92	RLPPDTLLQQV	"+++"
93	RLYTMDGITV	"++"
94	RMSDVVKGV	"+++"
95	SICNGVPMV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
96	SLLEEPNVIRV	"++++"
97	SLLPQLIEV	"++++"
98	SLLSPEHLQYL	"+++"
99	SLSAFLPSL	"++++"
100	SLVGDIGNVNM	"++"
101	SLWEGGVRGV	"+++"
102	SLWSVARGV	"+++"
103	SMGDHLWVA	"+++"
104	SVWFGPKEV	"+++"
105	SVYDGKLLI	"++++"
106	TLAAIIHGA	"+++"
107	TLGQFYQEV	"++++"
108	TLLKKISEA	"+++"
109	TLYALSHAV	"+++"
110	TVGGSEILFEV	"++++"
111	TVMDIDTSGTFNV	"+++"
112	VLGEVKVGV	"++++"
113	VLMDKLVEL	"++++"
114	VLSQVYSKV	"+++"
115	VVLDDKDYFL	"+++"
116	WVIPAISAV	"++++"
117	YAFPKSITV	"+++"
118	YLDDEKNWGL	"+++"
119	YLDKNLTVSV	"+++"
120	YLGEEYVKA	"++"
121	YLITGNLEKL	"+++"
122	YLSQAADGAKVL	"++"
123	YLWDLDHGFAGV	"+++"
124	LLIDVVTYL	"++++"
125	ALYGRLEVV	"++++"
126	TLLDSPIKV	"+++"
127	VLIGSNHSL	"++++"
128	GLAFSLNGV	"++++"
129	SQADVIPAV	"+++"
130	ALDAGAVYTL	"++++"
131	ALDSGAFQSV	"+++"
132	ALHEEVVGV	"+++"
133	ALLEMDARL	"+++"
134	ALLETNPYLL	"++++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
135	ALLGKIEKV	"+++"
136	ALLNQHYQV	"+++"
137	ALPTVLVGV	"++++"
138	ALSQVTLLL	"++++"
139	ALSSKPAEV	"+++"
140	ALTSISAGV	"++++"
141	AMGEKSFSV	"++++"
142	AVIGGLIYV	"++++"
145	FLIAEYFEHV	"++"
146	FLWTEQAHTV	"++"
147	GLAPGGLAVV	"+++"
148	GLFAPLVFL	"++++"
149	GLLSGLDIMEV	"++++"
150	GLSNLGIKSI	"++++"
151	HLAKVTAEV	"+++"
152	KLDNNLDSV	"+++"
154	KLTDHLKYV	"+++"
156	LLFPHPVNQV	"++++"
157	QLLPNLRAV	"+++"
158	RIISGLVKV	"++"
159	RLFPDGIVTV	"+++"
160	RLLAKIICL	"++"
161	RLLDEQFAV	"+++"
162	RLMSALTQV-	"++"
163	RLTESVLYL	"+++"
164	RMLIKLLEV	"+++"
165	RVIEHVEQV	"++++"
166	SILDIVTKV	"+++"
167	SLAESSFDV	"+++"
168	SLAVLVPIV	"+++"
169	SLFEWFHPL	"+++"
170	SLHNGVIQL	"+++"
171	SLIPAVLTV	"+++"
172	SLLNFLQHL	"+++"
173	SLTSEIHFL	"+++"
174	TLAELGAVQV	"+++"
175	TLFEHLPHI	"+++"
176	TLGQIWDV	"++++"
177	VLDEPYEKV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
178	YIFTTPKSV	"+++"
179	YIHNILYEV	"++++"
180	YLGPHIASVTL	"+++"
181	YLLEKFVAV	"+++"
182	YLLHFPMAL	"+++"
183	YLYNNEEQVGL	"++"
184	VVLDGGQIVTV	"+++"
185	ALFPALRPGGFQA	"+++"
186	VLLAQIIQV	"+++"
187	SYPTFFPRF	"++++"
188	RYSAGWDAKF	"++++"
189	AFSPDSHYLLF	"+++"
190	RYNEKCFKL	"++++"
191	KYPDIISRI	"++++"
192	SYITKPEKW	"++++"
193	IYPGAFVDL	"++++"
195	RYAPPPSFSEF	"++++"
196	AYLKWISQI	"++++"
197	RWPKKSAEF	"++++"
198	LYWSHPRKF	"++++"
199	KFVTVQATF	"++++"
200	AYLLQPSQF	"++++"
201	AYVNTFHNI	"++++"
202	AYGTYRSNF	"++++"
203	YYGILQEKI	"++++"
205	VYGLQRNLL	"++++"
206	KWPETPLLL	"++++"
207	IYLERFPIF	"++++"
208	SYNPAENAVLL	"++++"
209	VFHPRQELI	"+++"
210	AYPAIRYLL	"++++"
211	IYIPSYFDF	"++++"
212	VYGDVISNI	"++++"
213	YYNKVSTVF	"++++"
214	IYVTSIEQI	"++++"
215	IYTGNISSF	"++++"
216	IYADVGEEF	"++++"
217	DYIPYVFKL	"++++"
218	VYQGAIRQI	"++++"
219	GVMAGDIYSV	"++++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
220	SLLEKELESV	"+++"
221	ALCEENMRGV	"+++"
222	LTDITKGV	"++"
223	FLFNTENKLLL	"++++"
224	ALASVIKEL	"+++"
225	KMDPVAYRV	"+++"
226	AVLGPLGLQEV	"+++"
227	ALLKVNQEL	"++++"
228	YLITSVELL	"++++"
229	KMFESFIESV	"+++"
230	VLTEFTREV	"++++"
231	RLFNDPVAMV	"++++"
232	KLAEIVKQV	"++++"
233	ALLGKLDAI	"++++"
234	YLEPYLKEV	"++++"
235	KLFEEIREI	"++++"
236	ALADKELLPSV	"+++"
237	ALRGEIETV	"+++"
238	AMPPPPPQGV	"++"
239	FLLGFIPAKA	"+++"
240	FLWERPTLLV	"+++"
241	FVLPLLGLHEA	"++"
242	GLFAPVHKV	"+++"
243	GLLDNPELRV	"+++"
244	KIAELLENV	"++++"
245	KLGAVFNQV	"++++"
246	KLISSYYNV	"+++"
247	KLLDTMVDTFL	"++++"
248	KLNDLIQRL	"+++"
249	LLLGERVAL	"++++"
250	NLAEVVERV	"++++"
251	RLFADILNDV	"++++"
252	RTIEYLEEV	"+++"
253	RVPPPPQSV	"++"
254	RVQEAIAEV	"+++"
255	SLFGQDVKAV	"+++"
256	SLFQGVEFHYV	"+++"
257	SLLEKAGPEL	"+++"
258	SLMGPVVHEV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
259	TLITDGMRSV-	"++"
260	TLMDMRLSQV	"+++"
261	VLFQEALWHV	"+++"
262	VLPNFLPYNV	"+++"
263	VLYPSLKEI	"+++"
264	VMQDPEFLQSV	"++++"
265	WLIEDGKVVTV	"++++"
266	SLLESNKDLLL	"+++"
267	ALNENINQV	"+++"
268	KLYQEVEIASV	"++++"
269	YLMEGSYNKV	"+++"
270	SVLDQKILL	"+++"
271	LLLDKLILL	"++++"
272	QQLDSKFLEQV	"+++"
273	AILETAPKEV	"+++"
274	ALAEALKEV	"++++"
275	ALIEGAGILL	"+++"
276	ALLEADVNIKL	"++++"
277	ALLEENSTPQL	"+++"
278	ALTSVVVTL	"++++"
279	ALWTGMHTI	"+++"
280	ATLNIIHSV	"+++"
281	GLLAGDRLVEV	"+++"
282	GQFPSYLETV	"+++"
283	ILSGIGVSQV	"+++"
284	KLDAFVEGV	"+++"
285	KLLDLSDSTSV	"+++"
286	KVLDKVFRA	"++++"
287	LIGEFLEKV	"++++"
288	LLDDSLVSI	"+++"
290	NLIDLDDLYV	"++++"
291	QLIDYERQL	"+++"
292	RIPAYFVTV	"++"
293	FLASESLIKQI	"++"
294	RLIDLHTNV	"++++"
295	SLFSSPPEI	"+++"
296	SLLSGRISTL	"+++"
297	TLFYSLREV	"+++"
298	TMAKESSIIGV	"++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
299	ALLRVTPFI	"+++"
300	TLAQQPTAV	"++"
302	KIQEILTQV	"++++"

EJEMPLO 4

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

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, los inventores llevaron a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de linfocitos T basado en estimulaciones reiteradas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo los inventores han podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 22 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 de la invención, lo cual demuestra que estos péptidos son epítopos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en humanos (Tabla 11).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

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

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

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

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

Los pMHC usados en las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A modificado/MART-1) 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 placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente $1x10^6$ linfocitos T CD8+ con $2x10^5$ microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Para la lectura de los multímeros pMHC con 8 moléculas pMHC distintas por condición se empleó una estrategia de codificación combinatoria bidimensional según lo descrito en otro lugar (Andersen et al., 2012), con pequeñas modificaciones que comprenden el acoplamiento con 5 fluorocromos distintos. Por último, los análisis de los multímeros se llevaron a cabo tiñendo las células con el colorante vital Live/dead® del IR cercano (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con

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

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de CHC

En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En la Figura 3 y la Figura 4 se muestran a título de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de tres péptidos de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 22 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 11A.

Tabla 11A: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I de la invención

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

SEQ ID	ID del péptido	Pocillos	Donantes
225	QAR-001	+++	++++
1	APOB-003	++	++++
2	ALDH1L1-001	++	++++
301	C1QTNF3-001	++	++++
15	SLC35B2-001	++	++++
16	ACSL3-001	++	++++
12	GPC3-001	+	++++
7	APOB-002	+	++++
303	MAGEB2-001	+	++
227	SAMM-001	+	+++
4	APOB-004	+	++++
226	THT-001	+	++++
6	AXIN2-001	+	++
232	MAPKAPK5-001	+	+++
10	USO-001	+	++
304	USP14-001	+	++++
219	ADF-012	+	++++
224	IFT81-001	+	+++
11	ZNF318-001	+	++
14	NCST-001	+	++
228	ACSL4-001	+	++
230	IPO9-001	+	++++

Tabla 11B: Inmunogenicidad *in vitro* de otros péptidos adicionales de HLA clase I que forman parte de la invención

Resultados a título de ejemplo de experimentos de inmunogenicidad *in vitro* efectuados por el solicitante con los péptidos restringidos a HLA-A*24 de la invención. Se muestran los resultados de la inmunogenicidad *in vitro*. Los porcentajes de pocillos y de donantes positivos (evaluables) se resumen del modo siguiente: 1-20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 %= +++; >= 70 %= ++++

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]	Donantes positivos [%]
187	SYPTFFPRF	"+"	"++++"
189	AFSPDSHYLLF	"+"	"++"
190	RYNEKCFKL	"+"	"++"
191	KYPDIISRI	"+"	"++++"

192	SYITKPEKW	"+"	"+++"
193	IYPGAFVDL	"+"	"+++"
194	QYASRFVQL	"+"	"+++"
196	AYLKWISQI	"+"	"+++"
197	RWPKKSAEF	"+"	"++"
198	LYWSHPRKF	"+"	"++"
199	KFVTVQATF	"+"	"++"
201	AYVNTFHNI	"++"	"++++"
202	AYGTYRSNF	"+"	"++++"
203	YYGILQEKI	"+"	"+++"
205	VYGLQRNLL	"+"	"+++"
207	IYLERFPIF	"++"	"++++"
208	SYNPAENAVLL	"+"	"+++"
209	VFHPRQELI	"++"	"++++"
210	AYPAIRYLL	"+"	"++++"
211	IYIPSYFDF	"++"	"++++"
212	VYGDVISNI	"+"	"++++"
215	IYTGNISSF	"+"	"++"
216	IYADVGEEF	"+"	"++"
217	DYIPYVFKL	"+++"	"++++"
218	VYQGAIRQI	"+"	"+++"

Resultados a título de ejemplo de respuestas *in vitro* de linfocitos T CD8+ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-A*02+ (Figura 3)

A los linfocitos T CD8+ se los estimuló con APC artificiales tapizadas con el AcM anti-CD28 y el HLA-A*02 acomplejado con los péptidos IMA-APOB-002 (SEQ ID N.º 7) (A, panel derecho) o IMA-APOB-003 (B, panel derecho, SEQ ID N.º 1), o IMA-ALDH1L1-001 (C, panel derecho, SEQ ID N.º 2), respectivamente. Luego de tres ciclos de estimulación, la detección de las células reactivas al péptido se efectuó mediante la tinción con multímeros en 2D con A*02/ APOB-002 (A) o A*02/ APOB-003 (B), o A*02/ALDH1L1-001. Los paneles de la izquierda (A, B, C) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos de A*02/péptido irrelevantes. Las subpoblaciones adecuadas de linfocitos CD8+ se seleccionaron entre los singletes celulares viables. Las selecciones booleanas ayudaron a excluir los falsos positivos detectados con multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

Resultados a título de ejemplo de respuestas *in vitro* de linfocitos CD8+ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-A*24+ (Figura 4)

A los linfocitos T CD8+ se los estimuló con APC artificiales tapizadas con el AcM anti-CD28 y HLA-A*24 acomplejado con los péptidos IMA-KLHL24-001 (SEQ ID N.º 190) (A, panel derecho) o IMA-APOB-006 (B, panel derecho, SEQ ID N.º 218), respectivamente. Luego de tres ciclos de estimulación, la detección de las células reactivas al péptido se efectuó mediante la tinción con multímeros en 2D con A*24/ KLHL24-001 (A) o A*24/ APOB-006 (B). Los paneles izquierdos (A y B) presentan la tinción de control de células estimuladas con complejos de A*24/péptido irrelevantes. Las subpoblaciones adecuadas de linfocitos CD8+ se seleccionaron entre los singletes celulares viables. Las selecciones booleanas ayudaron a excluir los falsos positivos detectados con multímeros específicos de diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

EJEMPLO 5: Síntesis de péptidos

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

Lista de referencias bibliográficas

Adler, A. S. et al., Genes Dev. **28** (2014)

Ahn, Y. H. et al., J Proteomics. **106** (2014)

Akiyama, H. et al., Oncol Rep. **21** (2009)

Alam, S. M. et al., Endocr. Relat Cancer **16** (2009)

Aleman, G. et al., Am J Physiol Endocrinol. Metab **289** (2005)

Alexanian, A. et al., Cancer Genomics Proteomics. **9** (2012)

Altenhofer, S. et al., J Biol. Chem. **285** (2010)

Alvarez, C. et al., J Biol. Chem. **276** (2001)

Ammerpohl, O. et al., Int. J Cancer **130** (2012)

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

Arai, E. et al., Carcinogenesis **33** (2012)

Araki, T. et al., J Biol. Chem. **286** (2011)

Arlt, A. et al., Oncogene **28** (2009)

Arndt, S. et al., Oncol Rep. **18** (2007)

Arner, E. S. et al., Eur. J Biochem. **267** (2000)

Atienza, J. M. et al., Mol Cancer Ther **4** (2005)

Avery-Kiejda, K. A. et al., BMC. Cancer **14** (2014)

Bachmann, S. B. et al., Mol Cancer **13** (2014)

Balogh, K. et al., Oncogene **31** (2012)

Bani, M. R. et al., Mol Cancer Ther **3** (2004)

Bansal, N. et al., PLoS. One. **6** (2011)

Barbarulo, A. et al., Oncogene **32** (2013)

Bell, J. C. et al., Drug Metab Dispos. **40** (2012)

Ben-Izhak, O. et al., Histopathology **41** (2002)

Bergada, L. et al., Lab Invest **94** (2014)

Bergeron, M. J. et al., Mol Aspects Med. **34** (2013)

Bhattacharya, C. et al., Mol Cancer **11** (2012)

Bhogaraju, S. et al., Science **341** (2013)

Bidkhori, G. et al., PLoS. One. **8** (2013)

Bieche, I. et al., Breast Cancer Res **6** (2004)

Biswas, S. et al., Biochim. Biophys. Acta **1832** (2013)

Blanke, K. L. et al., Cancer Causes Control **25** (2014)

Bodine, S. C. et al., Science **294** (2001)

Boehringer, J. et al., Biochem. J **448** (2012)

Bojjireddy, N. et al., J Cell Sci. (2014)

Booth, D. G. et al., EMBO J **30** (2011)

Bouquet, C. et al., Mol Ther **14** (2006)

Boylan, K. L. et al., Proteome. Sci. **8** (2010)

Braumuller, H. et al., Nature (2013)

Brockmoller, S. F. et al., J Proteome. Res **11** (2012)

Buch, S. C. et al., Mol Carcinog. **51 Suppl 1** (2012)

Bull, C. et al., Cancer Res **74** (2014)

Burrell, R. A. et al., Nature **494** (2013)

Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res **12** (2006)

Butterfield, L. H. et al., Clin. Cancer Res. **9** (2003)

Byrne, A. et al., Exp. Cell Res **316** (2010)

Cadenas, C. et al., Cell Cycle **13** (2014)

Cadoret, A. et al., Oncogene **21** (2002)

Cao, H. et al., Biochemistry **41** (2002)

Cao, Y. et al., Cancer Research **61** (2001)

Cao-Ehlker, X. et al., J Biol. Chem. **288** (2013)

Carroll, M. et al., J Interferon Cytokine Res **33** (2013)

Carrouel, F. et al., J Dent. Res **87** (2008)

Castro, M. et al., J Transl. Med. **8** (2010)

Chae, Y. S. et al., Med. Oncol **28** (2011)

Chang, L. O. et al., Cancer Res **33** (1973)

Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother. Pharmacol. **59** (2007)

Chapiro, J. et al., Radiol. Med. **119** (2014)

Charbonneau, B. et al., Am J Hematol. **87** (2012)

Chatterjee, M. et al., Haematologica **98** (2013)

Chen, J. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **420** (2012a)

Chen, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **108** (2011a)

Chen, R. et al., World J Gastroenterol. **17** (2011b)

Chen, X. et al., J Dig. Dis. **12** (2011c)

Chen, X. Q. et al., Med. Oncol **29** (2012b)

Cheng, L. et al., Genomics **102** (2013)

Choi, Y. W. et al., Int. J Gynecol. Cancer **17** (2007)

Christa, L. et al., Gastroenterology **106** (1994)

Clark, A. G. et al., Cytoskeleton (Hoboken.) **69** (2012)

Claro da, Silva T. et al., Mol. Aspects Med. **34** (2013)

Cohen, L. et al., Nature **395** (1998)

Collins, C. L. et al., Surgery **122** (1997)

Com, E. et al., J Proteomics. **75** (2012)

Copps, K. D. et al., Diabetologia **55** (2012)

Cornen, S. et al., PLoS. ONE. **9** (2014)

Cornez, I. et al., Biochem. Pharmacol. **75** (2008)

Cowling, V. H. , Oncogene **29** (2010)

Cui, T. et al., Int. J Oncol **39** (2011)

da Silva, M. G. et al., Exp. Clin Cardiol. **17** (2012)

Dadkhah, E. et al., Arch. Iran Med. **16** (2013)

Darmanis, S. et al., PLoS. One. **8** (2013)

Darvekar, S. et al., Biochem. J **442** (2012)

Darvekar, S. R. et al., PLoS. One. **9** (2014)

Datta, K. et al., J Biol. Chem. **284** (2009)

David, S. et al., Front Biosci. (Elite. Ed) **5** (2013)

de Almagro, M. C. et al., Biochem. Pharmacol. **81** (2011)

de Groot, J. F. et al., Cancer Res **65** (2005)

Deb, S. et al., Br. J Cancer **110** (2014)

Debauve, G. et al., Cell Mol Life Sci. **65** (2008)

Decker, T. et al., J Clin Invest **109** (2002)

Decock, A. et al., Genome Biol. **13** (2012)

Del Campo, E. M. et al., Mol Phylogenet. Evol. **66** (2013)

Delaval, B. et al., J Cell Biol. **188** (2010)

Deng, X. D. et al., Asian Pac. J Cancer Prev. **15** (2014)

Di, Gregorio E. et al., J Med. Genet. **50** (2013)

Diggle, C. P. et al., PLoS. Genet. **10** (2014)

Dimitrov, A. et al., Hum. Mol Genet. **18** (2009)

Dmitriev, O. Y. , Biochem. Cell Biol. **89** (2011)

Doherty, J. A. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **20** (2011)

Dong, Z. et al., Crit Rev. Oncol Hematol. **59** (2006)

Dou, R. et al., Cancer Lett. **336** (2013)

Drazkowska, K. et al., Nucleic Acids Res **41** (2013)

Edavana, V. K. et al., Drug Metab Dispos. **41** (2013)

Edwards, P. A. et al., Breast Cancer Res **14** (2012)

Elvenes, J. et al., PLoS. One. **6** (2011)

Emaduddin, M. et al., Cell Commun. Signal. **6** (2008)

Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. **6** (2014)

Epelbaum, R. et al., Pathol. Oncol Res **4** (1998)

Fan, T. W. et al., Mol Cancer **8** (2009)

Fang, Z. Q. et al., Genet. Mol Res **12** (2013)

Fassas, A. B. et al., Leuk. Lymphoma **45** (2004)

Feferman, L. et al., Prostate Cancer Prostatic. Dis. **16** (2013)

Fei, F. et al., J Cancer Res Clin Oncol (2014a)

Fei, F. et al., Ann Surg. Oncol **21** (2014b)

Feigelson, H. S. et al., Breast Cancer Res **10** (2008)

Feng, L. et al., Cell Biochem. Funct. **29** (2011)

Feng, M. et al., J Clin Invest **124** (2014a)

Feng, S. et al., Int. J Biol. Sci. **9** (2013)

Feng, Y. et al., J Biol. Chem. **289** (2014b)

Feng, Y. et al., Free Radic. Res **46** (2012)

Fernandes, C. F. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **361** (2007)

Ferre, S. et al., J Am Soc Nephrol. **25** (2014)

Ferrer-Ferrer, M. et al., Arch. Med. Res **44** (2013)

Filmus, J. et al., FEBS J **280** (2013)

Fiorito, V. et al., Biochim. Biophys. Acta **1839** (2014)

Fojo, A. T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **84** (1987)

Fonseca, A. L. et al., Genes Chromosomes. Cancer **51** (2012)

Fossdal, G. et al., ScientificWorldJournal. **2012** (2012)

Fournier, T. et al., Biochim. Biophys. Acta **1482** (2000)

Fu, W. et al., J Cell Sci. **123** (2010)

Fujitomo, T. et al., Cancer Res **72** (2012)

Furukawa, T. et al., Sci. Rep. **1** (2011)

Furutani, M. et al., Hepatology **24** (1996)

Gadd, S. et al., Lab Invest **90** (2010)

Gailani, D. , Trends Cardiovasc. Med. **10** (2000)

Galamb, O. et al., Helicobacter. **13** (2008)

Galazis, N. et al., Gynecol. Endocrinol. **29** (2013)

Gandhi, A. V. et al., Ann Surg. Oncol **20 Suppl 3** (2013)

Gao, L. et al., Mol Oncol **6** (2012)

Garcia-Baquero, R. et al., Tumour. Biol. **35** (2014)

Gardner-Stephen, D. A. et al., Drug Metab Dispos. **35** (2007)

Garg, M. et al., Cancer **116** (2010a)

Garg, M. et al., Eur. J Cancer **46** (2010b)

Gburcik, V. et al., Mol Cell Biol. **25** (2005)

Gergely, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **97** (2000)

Gervasini, G. et al., Cancer **107** (2006)

Getty, A. L. et al., Cell Mol Life Sci. **68** (2011)

Gilabert, M. et al., J Cell Physiol **228** (2013)

Gilkes, D. M. et al., Mol Cancer Res **11** (2013)

Giovannetti, E. et al., J Natl. Cancer Inst. **106** (2014)

Gokmen-Polar, Y. et al., Mod. Pathol. (2014)

Goldstein, I. et al., Carcinogenesis **34** (2013)

Gong, Y. et al., Genet. Mol Res **12** (2013)

Goode, E. L. et al., Clin Cancer Res **16** (2010)

Gordon, E. M. et al., Am. J Pediatr. Hematol. Oncol **15** (1993)

Gotzmann, J. et al., Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr. **9** (1999)

Gray, L. R. et al., Cell Mol Life Sci. **71** (2014)

Gregory, P. A. et al., J Biol. Chem. **278** (2003)

Greif, P. A. et al., Leukemia **25** (2011)

Gu, W. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Guo, L. et al., Cancer Sci. **103** (2012)

Halon, A. et al., Arch. Gynecol. Obstet. **287** (2013)

Hamamoto, R. et al., Cancer Sci. **97** (2006)

Hamilton, S. R. et al., Glycobiology **15** (2005)

Hamm, A. et al., BMC. Cancer **8** (2008)

Hanioka, N. et al., Basic Clin Pharmacol. Toxicol. **110** (2012)

Harris, M. et al., Pharmacogenet. Genomics **24** (2014)

Hatakeyama, H. et al., Proteomics. **6** (2006)

Havens, M. A. et al., PLoS. Genet. **10** (2014)

He, P. et al., Hum. Pathol. **35** (2004)

He, X. et al., Neoplasma **61** (2014a)

He, Y. et al., Mol Carcinog. (2014b)

Hellwinkel, O. J. et al., Prostate Cancer Prostatic. Dis. **14** (2011)

Hemmingsson, O. et al., Oncol Rep. **22** (2009)

Hidalgo-Curtis, C. et al., Br. J Haematol. **148** (2010)

Hider, J. L. et al., BMC. Evol. Biol. **13** (2013)

Hinsch, N. et al., BMC. Cancer **9** (2009)

Hirota, Y. et al., Nucleic Acids Res **28** (2000)

Hlavata, I. et al., Mutagenesis **27** (2012)

Hoelz, D. J. et al., Proteomics. **6** (2006)

Holden, H. M. et al., Cell Mol Life Sci. **61** (2004)

Honda, K. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Hong, Y. et al., J Biol. Chem. **274** (1999)

Hood, F. E. et al., Bioarchitecture. **1** (2011)

Hood, F. E. et al., J Cell Biol. **202** (2013)

Hopfer, O. et al., Br. J Cancer **93** (2005)

Horani, A. et al., Am J Hum. Genet. **91** (2012)

Hou, M. et al., Int. J Mol Med. **33** (2014)

Hu, D. G. et al., Drug Metab Rev. **46** (2014)

Hua, D. et al., Int. J Mol Med. **30** (2012a)

Hua, T. et al., J Biol. Chem. **287** (2012b)

Huang, O. et al., Jpn. J Clin Oncol **43** (2013)

Huang, S. et al., Oncogene **21** (2002)

Huang, Y. et al., Oncotarget. **5** (2014)

Hughes, H. et al., J Cell Sci. **123** (2010)

Hunecke, D. et al., J Pathol. **228** (2012)

Huopaniemi, L. et al., Glycobiology **14** (2004)

Hyung, S. W. et al., Mol Cell Proteomics. **10** (2011)

Iannitti, T. et al., Mar. Drugs **8** (2010)

Ichida, K. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **282** (2001)

Ignatova, I. D. et al., Am J Physiol Endocrinol. Metab **296** (2009)

Ikeda, R. et al., Int. J Oncol **38** (2011)

Inuzuka, M. et al., J Biol. Chem. **280** (2005)

Ishiguro, H. et al., Oncogene **21** (2002)

Ishizaki, F. et al., Sci. Rep. **3** (2013)

Ivashchenko, A. T. et al., Biomed. Res Int. **2013** (2013)

Jacquemier, J. et al., Cancer Res **65** (2005)

Jacques, C. et al., Br. J Cancer **101** (2009)

Jaffe, E. K. et al., Arch. Biochem. Biophys. **530** (2013)

Jakobsson, A. et al., Prog. Lipid Res **45** (2006)

Jamroziak, K. et al., Eur. J Haematol. **72** (2004)

Jeung, H. C. et al., Oncologist. **12** (2007)

Jia, Y. et al., Br. J Cancer **110** (2014)

Jiang, J. G. et al., Cancer Res **65** (2005)

Jiang, X. et al., Histol. Histopathol. **25** (2010)

Jiang, X. et al., Mol Carcinog. (2014)

Jin, Z. et al., Int. J Clin Exp. Pathol. **7** (2014)

Jockusch, H. et al., Proteomics. **14** (2014)

Johnson, M. A. et al., Ann N. Y. Acad. Sci. **1012** (2004)

Jose-Eneriz, E. S. et al., Br. J Haematol. **142** (2008)

Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987)

Jung, H. J. et al., J Mol Med. (Berl) **91** (2013)

Kaira, K. et al., Hepatobiliary. Pancreat. Dis. Int. **13** (2014)

Kalsotra, A. et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. **199** (2004)

Kalthoff, S. et al., J Biol. Chem. **285** (2010)

Kamiyama, S. et al., Glycobiology **21** (2011)

Kamiyama, S. et al., J Biol. Chem. **281** (2006)

Kandil, D. H. et al., Adv. Anat. Pathol. **16** (2009)

Kandimalla, R. et al., Nat Rev. Urol. **10** (2013)

Karvonen, U. et al., J Mol Biol. **382** (2008)

Kelleher, D. J. et al., Glycobiology **16** (2006)

Khan, A. P. et al., Neoplasia. **15** (2013)

Kim, Y. et al., Hum. Pathol. **46** (2015)

Kim, Y. W. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Klein, C. J. et al., Neurology **82** (2014)

Kobayashi, T. et al., Biochem. J **400** (2006)

Kollmann, K. et al., Cancer Cell **24** (2013)

Komatsu, M. et al., Pharmacol. Res **66** (2012)

Kong, S. Y. et al., Cancer Sci. **99** (2008)

Kovacevic, Z. et al., Biochim. Biophys. Acta **1783** (2008)

Kracmarova, A. et al., Leuk. Lymphoma **49** (2008)

Kraemer, N. et al., Cell Mol Life Sci. **68** (2011)

Kress, T. R. et al., Mol Cell **41** (2011)

Krohn, A. et al., J Pathol. **231** (2013)

Krupenko, S. A. et al., Cell Growth Differ. **13** (2002)

Kubota, H. et al., Cell Stress. Chaperones. **15** (2010)

Kummel, D. et al., EMBO Rep. **6** (2005)

Kunutsor, S. K. et al., Int. J Cancer (2014)

Kuriyama, H. et al., Gene **253** (2000)

Laezza, F. et al., Mol Cell Neurosci. **34** (2007)

Lahiri, S. et al., PLoS. Biol. **12** (2014)

Lando, M. et al., J Pathol. **230** (2013)

Lapucci, A. et al., FASEB J **24** (2010)

Lascorz, J. et al., BMC. Med. Genet. **13** (2012)

Lauffart, B. et al., BMC. Womens Health **5** (2005)

Laverdiere, I. et al., Endocr. Relat Cancer (2014)

Leasure, C. D. et al., Plant Physiol **150** (2009)

Lee, C. H. et al., Hum. Reprod. **24** (2009)

Lee, K. W. et al., J Biol. Chem. **288** (2013)

Lee, S. J. et al., Toxicol. Lett. (2014)

Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005)

Lee, Y. C. et al., Int. J Cancer **122** (2008)

Lekva, T. et al., PLoS. One. **8** (2013)

LeRoy, P. J. et al., Cancer Res **67** (2007)

Leung, T. et al., Breast Cancer Res **15** (2013)

Levenson, V. V. et al., Somat. Cell Mol Genet. **25** (1999)

Levi, S. et al., Front Pharmacol. **5** (2014)

Li, D. et al., Protein Cell **5** (2014a)

Li, N. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **455** (2014)

Li, X. et al., Med. Oncol **31** (2014b)

Li, Y. et al., Mol Cell Biol. **29** (2009)

Li, Y. H. et al., World J Gastroenterol. **18** (2012)

Liang, J. et al., PLoS. One. **3** (2008)

Lillig, C. H. et al., Antioxid. Redox. Signal. **9** (2007)

Lin, C. H. et al., J Cell Biol. **189** (2010)

Lin, M. C. et al., Oral Oncol **50** (2014)

Lin, S. H. et al., Oncogene **23** (2004)

Lin, Z. et al., Cell Rep. **5** (2013)

Linderoth, J. et al., Br. J Haematol. **141** (2008)

Line, A. et al., Cancer Immunol Immunother. **51** (2002)

Ling, C. et al., EMBO J **26** (2007)

Linge, A. et al., J Proteome. Res **13** (2014)

Lioutas, A. et al., EMBO Rep. **14** (2013)

Liu, C. et al., Nat Med. **20** (2014)

Liu, C. et al., J Natl. Cancer Inst. **105** (2013a)

Liu, H. et al., Carcinogenesis **34** (2013b)

Liu, T. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **106** (2009a)

Liu, W. et al., J Biol. Chem. **279** (2004)

Liu, Y. et al., Curr. Drug Targets. **13** (2012)

Liu, Y. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **18** (2009b)

Liu, Y. et al., Oncol Rep. **18** (2007)

Ljungberg, B. , Curr. Opin. Urol. **17** (2007)

Llovet, J. M. et al., N. Engl. J Med. **359** (2008)

Lo Re, A. E. et al., J Biol. Chem. **287** (2012)

Lo, W. Y. et al., J Proteome. Res **6** (2007)

Lombardo, Y. et al., Breast Cancer Res **16** (2014)

Lourenco, G. J. et al., Breast Cancer Res Treat. **100** (2006)

Lovelace, L. L. et al., J Biol. Chem. **286** (2011)

Lung, H. L. et al., Int J Cancer **127** (2010)

Lutcke, H. , Eur. J Biochem. **228** (1995)

Ma, X. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **100** (2003)

Mackiewicz, A. et al., Glycoconj. J **12** (1995)

Mahajan, K. et al., Cancer Lett. **338** (2013)

Mamtani, M. et al., BMC. Res Notes **5** (2012)

Mariani, L. et al., Clin Cancer Res **7** (2001)

Marina, M. et al., Front Biosci. (Landmark. Ed) **19** (2014)

Markiewski, M. M. et al., Nat Immunol **9** (2008)

Martin, T. A. et al., Eur. J Cancer **40** (2004)

Martinez, H. D. et al., Genes Cancer **2** (2011)

Mathison, J. et al., Pathobiology **59** (1991)

Matsubara, J. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **20** (2011)

Matusiak, D. et al., J Histochem. Cytochem. **55** (2007)

McGuire, T. A. , Md Med. J **40** (1991)

Medjkane, S. et al., Cell Cycle **11** (2012)

Meijers, J. C. et al., Br. J Haematol. **108** (2000)

Mercer, C. A. et al., Autophagy. **5** (2009)

Mercurio, F. A. et al., Biochemistry **51** (2012)

Midorikawa, Y. et al., Jpn. J Cancer Res. **93** (2002)

Miled, C. et al., Cancer Res **65** (2005)

Milkereit, P. et al., J Biol. Chem. **278** (2003)

Miller, J. C. et al., Mol Carcinog. **48** (2009)

Mohelnikova-Duchonova, B. et al., Pancreas **42** (2013)

Monaco, M. E. et al., Transl. Oncol **3** (2010)

Morandi, F. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Morrissey, J. J. et al., Urology **83** (2014)

Mu, J. et al., J Biol. Chem. **272** (1997)

Murray, D. W. et al., Br. J Cancer **110** (2014)

Murray, J. I. et al., Mol Biol. Cell **15** (2004)

Murrin, L. C. et al., J Neuroimmune. Pharmacol. **2** (2007)

Murthy, K. G. et al., Genes Dev. **9** (1995)

Mydlikova, Z. et al., Neoplasma **57** (2010)

Narita, T. et al., Mol Cell Biol. **23** (2003)

Narjoz, C. et al., PLoS. One. **9** (2014)

Nelson, E. R. et al., Science **342** (2013)

Ngeow, J. et al., Cancer Discov. **4** (2014)

Nibbe, R. K. et al., Mol. Cell Proteomics. **8** (2009)

Nielsen, M. J. et al., Blood **108** (2006)

Noda, T. et al., Hepatology **55** (2012)

Noh, C. K. et al., Clin Biochem. **47** (2014)

Ntikoudi, E. et al., Cancer Treat. Rev. **40** (2014)

Nwosu, V. et al., Hum. Mol Genet. **10** (2001)

Obholz, K. L. et al., Dev. Biol. **298** (2006)

Oeffner, F. et al., Am J Hum. Genet. **84** (2009)

Ofman, R. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **281** (2001)

Ohshima, K. et al., Mol Biol. Evol. **27** (2010)

Oiso, S. et al., Oncol Rep. **31** (2014)

Oji, Y. et al., Int. J Oncol **44** (2014)

Osada, H. et al., Int. J Cancer **112** (2004)

Otero-Rey, E. M. et al., Oral Oncol **44** (2008)

Palmer, D. H. et al., Hepatology **49** (2009)

Panico, F. et al., Adv. Cancer Res **105** (2009)

Park, B. L. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **363** (2007)

Patel, M. R. et al., Laryngoscope **121** (2011)

Patel, S. A. et al., Br. J Cancer (2014)

Pattani, K. M. et al., PLoS. ONE. **7** (2012)

Pavelec, D. M. et al., Genetics **183** (2009)

Pawlowska, M. et al., Drug Metab Dispos. **41** (2013)

Pehlivan, D. et al., Eur. J Hum. Genet. **22** (2014)

Pei, Z. et al., PLoS. One. **8** (2013)

Pellanda, H. et al., Int. J Biochem. Cell Biol. **44** (2012)

Peng, R. et al., J Cell Biol. **157** (2002)

Perera, S. et al., J Muscle Res Cell Motil. **33** (2012)

Persaud-Sawin, D. A. et al., Hum. Mol Genet. **11** (2002)

Peters, D. G. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **14** (2005)

Pizon, V. et al., J Cell Sci. **115** (2002)

Placke, T. et al., Blood **124** (2014)

Plebani, R. et al., Neoplasia. **14** (2012)

Poh, W. et al., Mol Cancer **11** (2012)

Porkka, K. P. et al., Genes Chromosomes. Cancer **39** (2004)

Pylypenko, O. et al., Mol Cell **11** (2003)

Qi, L. et al., Cancer Res **74** (2014)

Qin, Y. et al., Pigment Cell Melanoma Res **26** (2013)

Quayle, S. N. et al., Neuro Oncol **14** (2012)

Quek, H. H. et al., DNA Cell Biol. **16** (1997)

Quidville, V. et al., Cancer Res **73** (2013)

Rajadhyaksha, A. M. et al., Am. J Hum. Genet. **87** (2010)

Rajasekaran, A. K. et al., Nucleic Acids Res **23** (1995)

Rajendran, M. et al., Cancer Metastasis Rev. **29** (2010)

Rakheja, D. et al., Mol Genet. Metab **93** (2008)

Ramana, C. V. et al., EMBO J **19** (2000)

Rashad, N. M. et al., Cytokine **68** (2014)

Rath, N. et al., EMBO Rep. **13** (2012)

Recupero, D. et al., Rom. J Morphol. Embryol. **51** (2010)

Reinisch, W. et al., J Immunother. **25** (2002)

Rekdal, C. et al., J Biol. Chem. **275** (2000)

Ren, Y. G. et al., Mol Biol. Cell **15** (2004)

Rennoll, S. A. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **443** (2014)

Rifas, L. et al., Arthritis Rheum. **60** (2009)

Riihila, P. M. et al., J Invest Dermatol. **134** (2014)

Rodriguez, F. J. et al., J Neuropathol. Exp. Neurol. **67** (2008)

Rogov, V. et al., Mol Cell **53** (2014)

Romanuik, T. L. et al., BMC. Genomics **10** (2009)

Roodman, G. D. , Ann N. Y. Acad. Sci. **1192** (2010)

Rosado, I. V. et al., RNA. **10** (2004)

Rose, A. E. et al., Cancer Res **71** (2011)

Ross, H. et al., Arch. Pathol. Lab Med. **136** (2012)

Rossi, M. R. et al., Cancer Genet. Cytogenet. **161** (2005)

Rotondo, R. et al., Int. J Cancer **125** (2009)

Rucksaken, R. et al., Cancer Biomark. **12** (2012)

Ruiz, F. X. et al., Biochem. J **440** (2011)

Ruiz, F. X. et al., Front Pharmacol. **3** (2012)

Rutkowski, M. J. et al., Mol Cancer Res **8** (2010)

Rylova, S. N. et al., Cancer Res **62** (2002)

Sahm, F. et al., Cancer Res **73** (2013)

Sahu, A. et al., Immunol Res **17** (1998)

Saito, T. et al., J Biol. Chem. **278** (2003)

Salahshor, S. et al., J Clin Pathol. **58** (2005)

Sang, W. et al., Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi. **42** (2013)

Sangro, B. et al., J Clin Oncol **22** (2004)

Sanz, L. et al., Mol Cell Biol. **15** (1995)

Saponaro, C. et al., Cancer Biomark. **14** (2014)

Sarajlic, A. et al., Breast Cancer Res Treat. **143** (2014)

Sasahira, T. et al., Eur. J Cancer **50** (2014)

Schneider, E. et al., Clin Chim. Acta **374** (2006)

Schofield, A. V. et al., Crit Rev. Biochem. Mol Biol. **48** (2013)

Schulz, E. G. et al., Immunity. **30** (2009)

Seifert, M. et al., J Pathol. **205** (2005)

Senchenko, V. et al., Oncogene **22** (2003)

Shaughnessy, J. D. , Jr. et al., Blood **118** (2011)

Shen, F. et al., J Cell Biochem. **112** (2011)

Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004a)

Shi, Y. et al., Exp. Cell Res **296** (2004b)

Shi, Z. Z. et al., Clin Transl. Oncol **16** (2014)

Shinji, S. et al., Oncol Rep. **15** (2006)

Shodeinde, A. et al., J Mol Biochem. **2** (2013)

Shubbar, E. et al., BMC. Cancer **13** (2013)

Shurbaji, M. S. et al., Am J Clin Pathol. **96** (1991)

Sillars-Hardebol, A. H. et al., Gut **61** (2012)

Singh, S. et al., Tumour. Biol. (2014)

Smith, P. et al., Clin Cancer Res **13** (2007)

Song, C. et al., J Biol. Chem. **288** (2013)

Srivenugopal, K. S. et al., Cancer Lett. **117** (1997)

Staal-van den Brekel AJ et al., Br. J Cancer **76** (1997)

Steen, H. C. et al., J Interferon Cytokine Res. **32** (2012)

Stefanska, B. et al., Clin Cancer Res **20** (2014)

Strassburg, C. P. et al., J Biol. Chem. **273** (1998)

Strassburg, C. P. et al., Mol Pharmacol. **52** (1997)

Sudo, H. et al., Genomics **95** (2010)

Sugihara, T. et al., J Biol. Chem. **276** (2001)

Sun, C. et al., Pathol. Res Pract. **210** (2014)

Sun, X. et al., J Pathol. **226** (2012)

Sun, X. et al., Protein Cell **4** (2013)

Sun, X. J. et al., Zhonghua Yi. Xue. Yi. Chuan Xue. Za Zhi. **22** (2005)

Supernat, A. et al., Oncol Lett. **4** (2012)

Surmacz, E. , J Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. **18** (2013)

Suzuki, K. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **368** (2008)

Swallow, C. J. et al., Oncogene **24** (2005)

Tabuchi, K. et al., J Neurosci. **22** (2002)

Taguchi, O. et al., Clin Chim. Acta **244** (1996)

Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991)

Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000)

Takeda, Y. et al., Glycobiology **24** (2014)

Takemasa, I. et al., Int. J Oncol **40** (2012)

Takeuchi, A. et al., Mol Cell Endocrinol. **384** (2014)

Tan, L. Z. et al., Am J Pathol. **183** (2013)

Tan, M. K. et al., Mol Cell Biol. **31** (2011)

Tanahashi, N. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **243** (1998)

Tanaka, M. et al., Mol Med. Rep. **7** (2013)

Tang, L. et al., Arch. Med. Res **43** (2012)

Tang, X. H. et al., Annu. Rev. Pathol. **6** (2011)

Tao, J. et al., Sci. Transl. Med. **3** (2011)

Tao, R. H. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **341** (2006)

Tao, T. et al., Cell Res **23** (2013)

Tarao, K. et al., Cancer **86** (1999)

Tarao, K. et al., Cancer **79** (1997)

Tasker, P. N. et al., Osteoporos. Int. **17** (2006)

Telikicherla, D. et al., Clin Proteomics. **9** (2012)

Tian, T. et al., Eur. J Cancer **48** (2012)

Tian, Y. et al., BMC. Cancer **14** (2014)

Tomiyama, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **107** (2010)

Tomoda, T. et al., J Gastroenterol. Hepatol. **27** (2012)

Tong, J. et al., PLoS. One. **8** (2013)

Tortorella, S. et al., J Membr. Biol. **247** (2014)

Tran, E. et al., Science **344** (2014)

Trougakos, I. P. , Gerontology **59** (2013)

Tsai, H. Y. et al., Oncogene **32** (2013)

Uddin, S. et al., Int. J Clin Exp. Pathol. **4** (2011)

Uehara, Y. et al., Cancer Res **43** (1983)

Urig, S. et al., Semin. Cancer Biol. **16** (2006)

Vainio, P. et al., Am. J Pathol. **178** (2011)

van der Spek, P. J. et al., Genomics **31** (1996)

van Zuylen, W. J. et al., PLoS. Pathog. **8** (2012)

van, den Broek, I et al., Proteomics. Clin Appl. **4** (2010)

van, Duin M. et al., Haematologica **96** (2011)

Vejda, S. et al., Mol Cell Proteomics. **1** (2002)

Vincent, F. et al., Cancer Res **69** (2009)

Wang, B. S. et al., Cell Stress. Chaperones. **18** (2013a)

Wang, D. et al., J Biol. Chem. **277** (2002)

Wang, J. et al., Eur. J Cancer Prev. **22** (2013b)

Wang, J. et al., J Clin Invest **112** (2003)

Wang, J. et al., Cancer Prev. Res (Phila) **6** (2013c)

Wang, J. C. et al., Oncology **81** (2011)

Wang, M. et al., Chin J Physiol **55** (2012)

Wang, S. K. et al., PLoS. Genet. **9** (2013d)

Wang, S. S. et al., PLoS. One. **5** (2010)

Wang, X. et al., Urol. Int. **92** (2014)

Wang, Y. et al., J Biol. Chem. **274** (1999)

Wang, Y. et al., Med. Oncol **32** (2015)

Wazir, U. et al., Cell Mol Biol. Lett. **18** (2013)

Wazir, U. et al., Anticancer Res **32** (2012)

Weiss, J. et al., Int. J Antimicrob. Agents **41** (2013)

Welsh, M. M. et al., Carcinogenesis **29** (2008)

Wieser, R. , Leuk. Lymphoma **43** (2002)

Wilhelm, S. M. et al., Cancer Res. **64** (2004)

Williams, A. L. et al., Nature **506** (2014)

Witte, I. et al., Cell Death. Dis. **2** (2011)

Wong, K. K. et al., Leukemia **28** (2014)

Wong, N. et al., J Hepatol. **38** (2003)

Wu, L. et al., Ann Hematol. **91** (2012)

Wu, N. et al., Int. J Mol Sci. **14** (2013a)

Wu, W. et al., Sci. China Life Sci. **56** (2013b)

Wu, X. et al., Am. J Clin Exp. Urol. **2** (2014)

Wu, Y. M. et al., Cancer Res **71** (2011)

Xiao, J. et al., J Biol. Chem. **276** (2001)

Xie, F. W. et al., Neoplasma **61** (2014)

Xu, H. et al., Cell Rep. **9** (2014)

Xu, X. et al., Proteomics. **10** (2010)

Yan, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **98** (2001)

Yang, C. et al., Virchows Arch. **463** (2013)

Yang, C. Y. et al., J Immunol **192** (2014a)

Yang, H. et al., Oncol Rep. **24** (2010)

Yang, H. W. et al., Oncogene **0** (2014b)

Yang, R. et al., Mol Cell Biol. **31** (2011a)

Yang, Z. J. et al., Mol Cancer Ther **10** (2011b)

Yau, C. et al., Breast Cancer Res **12** (2010)

Ye, X. H. et al., Mol Genet. Genomics (2014)

Yoon, J. K. et al., J Transl. Med. **12** (2014)

Yoshimura, S. et al., J Cell Biol. **191** (2010)

Yoshizuka, N. et al., Mol Cancer Res **10** (2012)

Yosten, G. L. et al., Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol **303** (2012)

Yu, J. H. et al., RNA. **11** (2005)

Yu, K. et al., PLoS. Genet. **4** (2008)

Yue, C. et al., Int. J Cancer **136** (2015)

Zamanian-Daryoush, M. et al., J Biol. Chem. **288** (2013)

Zarling, A. L. et al., Cancer Res **74** (2014)

Zekri, A. R. et al., Asian Pac. J Cancer Prev. **13** (2012)

Zelcer, N. et al., Mol Cell Biol. **34** (2014)

Zhang, D. et al., Pak. J Med. Sci. **29** (2013a)

Zhang, H. et al., Oncotarget. **4** (2013b)

Zhang, H. T. et al., Biochim. Biophys. Acta **1839** (2014a)

Zhang, J. et al., Drug Metab Dispos. **34** (2006)

Zhang, S. et al., BMC. Cancer **11** (2011)

Zhang, X. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Zhang, X. D. et al., Int. J Clin Exp. Med. **7** (2014b)

Zhao, Y. et al., Cell Death. Dis. **4** (2013)

Zhou, B. et al., Cancer Biol. Ther **13** (2012)

Zhou, D. et al., PLoS. One. **8** (2013a)

Zhou, J. et al., Oncol Rep. **30** (2013b)

Zhou, J. et al., Lung Cancer **14** (1996)

Zhu, H. et al., Cell Stress. Chaperones. (2014a)

Zhu, W. L. et al., Anticancer Res **29** (2009)

Zhu, X. et al., Biomed. Pharmacother. **68** (2014b)

Zhuang, Z. et al., J Neurosurg. **115** (2011)

Zietek, Z. et al., Pol. Tyg. Lek. **51** (1996)

Zou, W. et al., Cancer Sci. **101** (2010)

Zu, X. et al., Molecules. **18** (2013)

Zu, X. Y. et al., Recent Pat Anticancer Drug Discov. **7** (2012)

Zynda, E. R. et al., Cell Cycle **13** (2014)

I32728WO-C

Péptidos y combinación de péptidos para inmunoterapia contra el carcinoma hepatocelular (CHC) y otros tipos de cáncer

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

Antecedentes de la invención

El carcinoma hepatocelular (CHC) es uno de los tumores más frecuentes en el mundo y a escala mundial representa en torno al 6% de los nuevos casos de cáncer diagnosticados. En 2012 hubo alrededor de 782.000 casos nuevos de CHC en el mundo, lo que lo convierte en el quinto tipo de cáncer más frecuente en los varones (554.000 casos) y el noveno en las mujeres (228.000 casos) (http://globocan.iarc.fr). El CHC es la neoplasia maligna primaria de hígado más frecuente, pues supone más del 80% de los casos de cáncer hepático primario en adultos.

La distribución del CHC muestra una variación geográfica y las tasas de incidencia dependen del sexo. La tasa de incidencia ajustada a la edad del CHC en varones es máxima en el este (31,9) y el sudeste de Asia (22,2), intermedia en el sur de Europa (9,5) y Norteamérica (9,3) y baja en el norte de Europa (4,6) y en el sur y centro de Asia (3,7). Las tasas de incidencia del CHC en las mujeres son inferiores a las de los hombres. La tasa de incidencia ajustada a la edad máxima en la población femenina se da en el este de Asia (10,2) y el oeste de África (8,1), y es mínima en el norte de Europa (1,9) y en la Micronesia (1,6).

El pronóstico general de los pacientes con CHC es poco halagüeño. La supervivencia relativa a 5 años ronda el 15%, según el estadio en que se encuentre en el momento del diagnóstico. En el CHC localizado, cuando el cáncer permanece aún confinado en el hígado, la supervivencia relativa a 5 años ronda el 28%. En lo que concierne al CHC regional y a distancia, cuando el cáncer se ha extendido a los órganos cercanos o distantes, es del 7% y del 2%.

La incidencia de la CHC está relacionada con diversos factores de riesgo, siendo la cirrosis el más importante. La cirrosis suele estar vinculada al alcoholismo o a la infección por los virus de la hepatitis B o C, pero también puede tener su causa en metabolopatías como la diabetes de tipo II. Como resultado, el tejido hepático sano es sustituido por tejido cicatricial, lo que aumenta el riesgo de aparición del cáncer.

El tratamiento de la enfermedad depende del estadio tumoral en el momento del diagnóstico y del estado general del hígado. Cuando es posible se extirpa una parte del órgano (hepatectomía parcial), o bien entero (hepatectomía total). Los pacientes aptos para recibir un transplante hepático son aquellos que presentan tumores pequeños o totalmente resecables.

Cuando la extirpación quirúrgica no es una opción viable, existen otros tratamientos disponibles. Para la ablación del tumor, se introduce una sonda en el hígado y el tumor se destruye con radiación, microondas o crioterapia. En los procedimientos de

embolización se interrumpe la irrigación sanguínea del tumor con medios mecánicos o químicos. Como radioterapia también se pueden usar ondas de radio de alta energía para destruir el tumor.

La quimioterapia contra el CHC incluye combinaciones de doxorrubicina, 5-fluorouracilo y cisplatino como tratamiento sistémico, y doxorrubicina, floxuridina y mitomicina C en infusiones en la arteria hepática. Pese a todo, la mayoría de los CHC muestran una elevada resistencia a los antineoplásicos (Enguita-German and Fortes, 2014).

Las opciones terapéuticas contra el CHC avanzado irresecable se limitan a Sorafenib, un inhibidor de la tirosina-cinasa ligada a múltiples receptores (Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Sorafenib es el único fármaco sistémico del que se ha confirmado que aumenta la supervivencia unos 3 meses y actualmente supone la única opción de tratamiento experimental para tales pacientes (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008).

Últimamente se ha efectuado un pequeño número de ensayos clínicos de inmunoterapia contra el CHC. En ellos se ha recurrido a citocinas para activar subtipos de células inmunitarias y/o potenciar la inmunogenicidad antitumoral (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Otros ensayos han optado por la infusión de linfocitos infiltrantes en el tumor o de linfocitos activados extraídos de la sangre periférica (Shi et al., 2004a; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

Hasta la fecha se ha ejecutado un contado número de ensayos de vacunación terapéutica. Butterfield et al. llevaron a cabo dos ensayos con péptidos derivados de la alfa-fetoproteína (AFP) como vacuna o con células dendríticas cargadas *ex vivo* con péptidos de dicha proteína (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). En otros dos estudios diferentes se sensibilizaron células dendríticas (CD) autólogas *ex vivo* con un lisado de tumor autólogo (Lee et al., 2005)o con un lisado de la estirpe celular de hepatoblastoma HepG2 (Palmer et al., 2009). Hasta el momento los ensayos de vacunación se han saldado con pequeñas mejoras en los resultados clínicos.

Resumen de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, ésta se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255 o a una secuencia variante del mismo que es homóloga al menos en 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 255, en el que dicha variante se une a MHC y/o estimula linfocitos T que presentan reactividad cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido el polipéptido entero del que derivaría.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de la presente invención que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º 255, o una variante del mismo, que es homóloga al menos en un 80%, preferiblemente en el 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 80% o al menos en un 88%) a la SEQ ID N.º 255, en la que dicho péptido o una variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente de entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

La presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255. Los ejemplos se refieren además a las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 254, y de la SEQ ID N.º 256 a la SEQ ID N.º 300 como ejemplos de referencia.

Las tablas siguientes muestran los péptidos conformes con la presente invención, sus respectivas SEQ ID N.º, y los probables genes originarios (subyacentes) de tales péptidos. Todos los péptidos de la Tabla 1 se unen a los alelos HLA-A*02, y los péptidos de la Tabla 2 se unen a los alelos HLA-A*24. Los péptidos de la Tabla 3 han sido dados a conocer con anterioridad en grandes listados resultantes del cribado genético ultrarrápido con elevadas tasas de error o son el resultado del cálculo con algoritmos, pero no han sido vinculados en absoluto con el cáncer hasta ahora. Se unen a alelos HLA-A*02. Los péptidos de la Tabla 4 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos de la invención. Los péptidos se unen a A*02 o, si

se indica, a A*24. Los péptidos de la Tabla 5 además son útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de otras neoplasias malignas que sobreexpresan o presentan en exceso el correspondiente polipéptido subyacente.

Tabla 1: Péptidos HLA-A*02 conforme a la presente invención - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
1	VMAPFTMTI	338	APOB
2	KLQAGTVFV	10840	ALDH1L1
3	ILDDNMQKL	79611	ACSS3
4	KLQDFSDQL	338	APOB
5	ALVEQGFTV	338	APOB
6	KLSPTVVGL	8313	AXIN2
7	ALVDTLKFV	338	APOB
8	KLLEEATISV	54808	DYM
9	ALANQKLYSV	23195	MDN1
10	SLLEEFDFHV	8615	USO1
11	SLSQELVGV	24149	ZNF318
12	FLAELAYDL	2719	GPC3
13	GLIDTETAMKAV	3290	HSD11B1
14	ALADLTGTVV	23385	NCSTN
15	LLYGHTVTV	347734	SLC35B2
16	SLLGGNIRL	2181	ACSL3
17	RVAS*PTSGV	8660	IRS2
18	ALYGKTEVV	57513	CASKIN2
19	FLEETKATV	338	APOB
20	KLSNVLQQV	338	APOB
21	QLIEVSSPITL	338	APOB
22	RIAGIRGIQGV	23167	EFR3A
23	RLYDPASGTISL	23456	ABCB10
24	SLAEEKLQASV	2194	FASN
25	SLDGKAALTEL	338	APOB
26	SLLHTIYEV	85407	NKD1
27	TLPDFRLPEI	338	APOB
28	TLQDHLNSL	338	APOB
29	YIQDEINTI	338	APOB
30	YLGEGPRMV	5704	PSMC4
31	YQMDIQQEL	338	APOB
32	ALNAVRLLV	9368	SLC9A3R1
33	LLHGHIVEL	57678	GPAM
34	SLAEGTATV	540	ATP7B

35	SLQESILAQV	23644	EDC4
36	ILNVDGLIGV	47	ACLY
37	LLLPLLPPLSP	347252	IGFBPL1
38	ALADVVHEA	26873	OPLAH
39	ALDPKANFST	10188	TNK2
40	ALLAEGITWV	54499	TMCO1
41	ALLELDEPLVL	2158	F9
42	ALLGGNVRMML	2182	ACSL4
43	ALLGVWTSV	444	ASPH
44	ALQDAIRQL	51268	PIPOX
45	ALQDQLVLV	183	AGT
46	AMAEMKVVL	11283, 4051, 57834, 66002, 8529	CYP4F8,CYP4F3,CYP4F11, CYP4F12,CYP4F2
47	FLDTPIAKV	85407	NKD1
48	FLLEQPEIQV	5345	SERPINF2
49	FLYPEKDEPT	338	APOB
50	FTIPKLYQL	338	APOB
51	GLAEELVRA	5091	PC
52	GLFNAELLEA	3929	LBP
53	GLIHLEGDTV	81494	CFHR5
54	GLLDPNVKSIFV	79033	ERI3
55	GLYGRTIEL	55908	C19orf80
56	GVLPGLVGV	162515	SLC16A11
57	HLTEAIQYV	6097	RORC
58	ILADLNLSV	55705	IPO9
59	ILADTFIGV	222223	KIAA1324L
60	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
61	KIADFELPTI	338	APOB
62	KIAGTNAEV	2752	GLUL
63	KIDEKNFVV	5887	RAD23B
64	KILEETLYV	8443	GNPAT
65	KLFSGDELLEV	8777	MPDZ
66	KLHEEIDRV	1571	CYP2E1
67	KLKETIQKL	338	APOB
68	KLLAATVLLL	336	APOA2
69	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
70	KLLDLETERILL	2803	GOLGA4
71	KLLDNWDSV	335	APOA1
72	KLSEAVTSV	55258	THNSL2
73	KLTLVIISV	8647	ABCB11
74	KLYDLELIV	570	BAAT

75	KQMEPLHAV	284111	SLC13A5
76	LLADIGGDPFAA	3268	AGFG2
77	LLHEENFSV	6942	TCF20
78	LLIDDEYKV	23065	EMC1
79	LLLSTGYEA	23556	PIGN
80	LLYEGKLTL	440107	PLEKHG7
81	NLASFIEQVAV	5092	PCBD1
82	NVFDGLVRV	338	APOB
83	QLHDFVMSL	8647	ABCB11
84	QLTPVLVSV	1244	ABCC2
85	RILPKVLEV	10840	ALDH1L1
86	RLAAFYSQV	91289	LMF2
87	RLFEENDVNL	5053	PAH
88	RLIDRIKTV	60560	NAA35
89	RLIEEIKNV	347051	SLC10A5
90	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
91	RLPDIPLRQV	55656	INTS8
92	RLPPDTLLQQV	5986	RFNG
93	RLYTMDGITV	1571	CYP2E1
94	RMSDVVKGV	113251	LARP4
95	SICNGVPMV	54575, 54576, 54577, 54578, 54579, 54600, 54657, 54658, 54659	UGT1A10,UGT1A8,UGT1A7, UGT1A6,UGT1A5,UGT1A9,UGT1A4,UGT1A1,UGT1A3
96	SLLEEPNVIRV	4703	NEB
97	SLLPQLIEV	338	APOB
98	SLLSPEHLQYL	7512	XPNPEP2
99	SLSAFLPSL	54757	FAM20A
100	SLVGDIGNVNM	1401	CRP
101	SLWEGGVRGV	411	ARSB
102	SLWSVARGV	57678	GPAM
103	SMGDHLWVA	2752	GLUL
104	SVWFGPKEV	28982	FLVCR1
105	SVYDGKLLI	5445	PON2
106	TLAAIIHGA	5243	ABCB1
107	TLGQFYQEV	3700, 375346	ITIH4,TMEM110
108	TLLKKISEA	84675	TRIM55
109	TLYALSHAV	338	APOB
110	TVGGSEILFEV	1401	CRP
111	TVMDIDTSGTFNV	26063, 4833	DECR2,NME4
112	VLGEVKVGV	122622	ADSSL1

113	VLMDKLVEL	338	APOB
114	VLSQVYSKV	338	APOB
115	VVLDDKDYFL	100292290, 3336	HSPE1
116	WVIPAISAV	1528	CYB5A
117	YAFPKSITV	6566	SLC16A1
118	YLDDEKNWGL	5005	ORM2
119	YLDKNLTVSV	100293534, 720, 721	C4A,C4B
120	YLGEEYVKA	7018	TF
121	YLITGNLEKL	1314	COPA
122	YLSQAADGAKVL	2584	GALK1
123	YLWDLDHGFAGV	832	CAPZB
124	LLIDVVTYL	338	APOB
125	ALYGRLEVV	23294	ANKS1A
126	TLLDSPIKV	338	APOB
127	VLIGSNHSL	9919	SEC16A
128	GLAFSLNGV	81502	HM13
129	SQADVIPAV	55034	MOCOS
130	ALDAGAVYTL	10840	ALDH1L1
131	ALDSGAFQSV	55907	CMAS
132	ALHEEVVGV	1593	CYP27A1
133	ALLEMDARL	54512	EXOSC4
134	ALLETNPYLL	1209	CLPTM1
135	ALLGKIEKV	2590	GALNT2
136	ALLNQHYQV	2058	EPRS
137	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
138	ALSQVTLLL	392636	AGMO
139	ALSSKPAEV	256987	SERINC5
140	ALTSISAGV	392636	AGMO
141	AMGEKSFSV	57720	GPR107
142	AVIGGLIYV	366	AQP9
143	FILPDSLPLDTL	6632	SNRPD1
144	FIQLITGV	477, 478	ATP1A2,ATP1A3
145	FLIAEYFEHV	23743, 635	BHMT2,BHMT
146	FLWTEQAHTV	3953	LEPR
147	GLAPGGLAVV	58525	WIZ
148	GLFAPLVFL	6566	SLC16A1
149	GLLSGLDIMEV	383	ARG1
150	GLSNLGIKSI	122553	TRAPPC6B
151	HLAKVTAEV	6184	RPN1
152	KLDNNLDSV	80232	WDR26

153	KLIEVNEEL	100507203	SMLR1
154	KLTDHLKYV	3250	HPR
155	LLEPYKPPSAQ	439	ASNA1
156	LLFPHPVNQV	8518	IKBKAP
157	QLLPNLRAV	5092	PCBD1
158	RIISGLVKV	101060372, 2330	FMO5
159	RLFPDGIVTV	152831	KLB
160	RLLAKIICL	3075	CFH
161	RLLDEQFAV	9026	HIP1R
162	RLMSALTQV	9462	RASAL2
163	RLTESVLYL	368	ABCC6
164	RMLIKLLEV	6710, 6711	SPTB,SPTBN1
165	RVIEHVEQV	3034	HAL
166	SILDIVTKV	130132	RFTN2
167	SLAESSFDV	54658	UGT1A1
168	SLAVLVPIV	1361	CPB2
169	SLFEWFHPL	2519	FUCA2
170	SLHNGVIQL	1314	COPA
171	SLIPAVLTV	57462	KIAA1161
172	SLLNFLQHL	2968	GTF2H4
173	SLTSEIHFL	55755	CDK5RAP2
174	TLAELGAVQV	2875	GPT
175	TLFEHLPHI	2888	GRB14
176	TLGQIWDV	1778	DYNC1H1
177	VLDEPYEKV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1
178	YIFTTPKSV	22862	FNDC3A
179	YIHNILYEV	160518	DENND5B
180	YLGPHIASVTL	81671	VMP1
181	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11,DDX12P
182	YLLHFPMAL	1109	AKR1C4
183	YLYNNEEQVGL	1109	AKR1C4
184	VVLDGGQIVTV	6506	SLC1A2
185	ALFPALRPGGFQA	8878	SQSTM1
186	VLLAQIIQV	89797	NAV2

Tabla 2: Péptidos HLA-A*24 conformes a la presente invención con los números de SEQ ID - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
187	SYPTFFPRF	6596	HLTF
188	RYSAGWDAKF	8630	HSD17B6
189	AFSPDSHYLLF	3679	ITGA7
190	RYNEKCFKL	54800	KLHL24
191	KYPDIISRI	3978	LIG1
192	SYITKPEKW	79694	MANEA
193	IYPGAFVDL	51360	MBTPS2
194	QYASRFVQL	10733	PLK4
195	RYAPPPSFSEF	29066	ZC3H7A
196	AYLKWISQI	60561	RINT1
197	RWPKKSAEF	100132742, 100526842, 6139, 645296, 645441	RPL17P7, RPL17-C18orf32, RPL17, RPL17P39, RPL17P6
198	LYWSHPRKF	6235, 648343	RPS29, RPS29P9
199	KFVTVQATF	718	C3
200	AYLLQPSQF	732	C8B
201	AYVNTFHNI	1201	CLN3
202	AYGTYRSNF	9919	SEC16A
203	YYGILQEKI	10237	SLC35B1
204	KYRLTYAYF	2266	FGG
205	VYGLQRNLL	57159, 84675, 84676	TRIM54, TRIM55, TRIM63
206	KWPETPLLL	55757	UGGT2
207	IYLERFPIF	51096	UTP18
208	SYNPAENAVLL	1314	COPA
209	VFHPRQELI	1314	COPA
210	AYPAIRYLL	7818	DAP3
211	IYIPSYFDF	27042	DIEXF
212	VYGDVISNI	8893	EIF2B5
213	YYNKVSTVF	8661	EIF3A
214	IYVTSIEQI	55879	GABRQ
215	IYTGNISSF	8836	GGH
216	IYADVGEEF	100302182, 11052	MIR1279, CPSF6
217	DYIPYVFKL	338	APOB
218	VYQGAIRQI	338	APOB

Tabla 3: Péptidos adicionales acordes con la presente invención sin vinculación previa conocida con el cáncer - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
219	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
220	SLLEKELESV	1819	DRG2
221	ALCEENMRGV	1938	EEF2

222	LTDITKGV	1938	EEF2
223	FLFNTENKLLL	3422	IDI1
224	ALASVIKEL	28981	IFT81
225	KMDPVAYRV	5859	QARS
226	AVLGPLGLQEV	79178	THTPA
227	ALLKVNQEL	25813	SAMM50
228	YLITSVELL	2182	ACSL4
229	KMFESFIESV	5576	PRKAR2A
230	VLTEFTREV	55705	IPO9
231	RLFNDPVAMV	10195	ALG3
232	KLAEIVKQV	8550	MAPKAPK5
233	ALLGKLDAI	5876	RABGGTB
234	YLEPYLKEV	727947,7381	UQCRB
235	KLFEEIREI	255394	TCP11L2
236	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
237	ALRGEIETV	10128	LRPPRC
238	AMPPPPPQGV	5885	RAD21
239	FLLGFIPAKA	5976	UPF1
240	FLWERPTLLV	79922	MRM1
241	FVLPLLGLHEA	55161	TMEM33
242	GLFAPVHKV	6249	CLIP1
243	GLLDNPELRV	26263	FBXO22
244	KIAELLENV	9100	USP10
245	KLGAVFNQV	23450	SF3B3
246	KLISSYYNV	84928	TMEM209
247	KLLDTMVDTFL	100527963,11243	PMF1-BGLAP,PMF1
248	KLNDLIQRL	1314	COPA
249	LLLGERVAL	23475	QPRT
250	NLAEVVERV	26263	FBXO22
251	RLFADILNDV	64755	C16orf58
252	RTIEYLEEV	3030	HADHA
253	RVPPPPQSV	6464	SHC1
254	RVQEAIAEV	57678	GPAM
255	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
256	SLFQGVEFHYV	3930	LBR
257	SLLEKAGPEL	54625	PARP14
258	SLMGPVVHEV	5116	PCNT
259	TLITDGMRSV	29894	CPSF1
260	TLMDMRLSQV	24148	PRPF6
261	VLFQEALWHV	2194	FASN
262	VLPNFLPYNV	10299	MARCH6

263	VLYPSLKEI	50717,5824	DCAF8,PEX19
264	VMQDPEFLQSV	266971,5710	PIPSL,PSMD4
265	WLIEDGKVVTV	10726	NUDC
266	SLLESNKDLLL	6520	SLC3A2
267	ALNENINQV	80025	PANK2
268	KLYQEVEIASV	5976	UPF1
269	YLMEGSYNKV	5714	PSMD8
270	SVLDQKILL	9875	URB1
271	LLLDKLILL	85440	DOCK7
272	QQLDSKFLEQV	6772	STAT1
273	AILETAPKEV	6238	RRBP1
274	ALAEALKEV	55164	SHQ1
275	ALIEGAGILL	10440	TIMM17A
276	ALLEADVNIKL	6729	SRP54
277	ALLEENSTPQL	83933	HDAC10
278	ALTSVVVTL	1021	CDK6
279	ALWTGMHTI	51479	ANKFY1
280	ATLNIIHSV	51542	VPS54
281	GLLAGDRLVEV	9368	SLC9A3R1
282	GQFPSYLETV	54919	HEATR2
283	ILSGIGVSQV	3703	STT3A
284	KLDAFVEGV	528	ATP6V1C1
285	KLLDLSDSTSV	6093	ROCK1
286	KVLDKVFRA	375056	MIA3
287	LIGEFLEKV	8731	RNMT
288	LLDDSLVSI	25824	PRDX5
289	LLLEEGGLVQV	7353	UFD1L
290	NLIDLDDLYV	57187	THOC2
291	QLIDYERQL	11072	DUSP14
292	RIPAYFVTV	7407	VARS
293	FLASESLIKQI	4736	RPL10A
294	RLIDLHTNV	23256	SCFD1
295	SLFSSPPEI	252983	STXBP4
296	SLLSGRISTL	51133,92799	KCTD3,SHKBP1
297	TLFYSLREV	80233	C17orf70
298	TMAKESSIIGV	1429	CRYZ
299	ALLRVTPFI	401505	TOMM5
300	TLAQQPTAV	4802	NFYC

Tabla 4: Péptidos útiles, entre otros usos, para terapias personalizadas contra el cáncer - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
301	VLADFGARV	114899,23600	C1QTNF3,AMACR
302	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
303	GVYDGEEHSV	4113	MAGEB2
304	SLIDQFFGV	9097	USP14
305	GVLENIFGV	399909	PCNXL3
306	KLVEFDFLGA	10460	TACC3
307	AVVEFLTSV	29102	DROSHA
308	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
309	GLIEIISNA	23020	SNRNP200
310	SLWGGDVVL	157680	VPS13B
311	FLIPIYHQV	31	ACACA
312	RLGIKPESV	1466	CSRP2
313	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
314	YLAPFLRNV	23019	CNOT1
315	KVLDGSPIEV	29974	A1CF
316	LLREKVEFL	4779	NFE2L1
317	KLPEKWESV	26156	RSL1D1
318	KLNEINEKI	1373	CPS1
319	KLFNEFIQL	10885	WDR3
320	GLADNTVIAKV	6897	TARS
321	GVIAEILRGV	10528	NOP56
322	ILYDIPDIRL	10667	FARS2
323	KIIDEDGLLNL	5981	RFC1
324	RLFETKITQV	100293534,720,721	C4A,C4B
325	RLSEAIVTV	51249	TMEM69
326	ALSDGVHKI	55179	FAIM
327	GLNEEIARV	10403	NDC80
328	RLEEDDGDVAM	10482	NXF1
329	SLIEDLILL	64754	SMYD3
330	SMSADVPLV	5111	PCNA
331	SLLAQNTSWLL	7070	THY1
332	AMLAVLHTV	60673	C12orf44
333	GLAEDIDKGEV	1938	EEF2
334	SILTIEDGIFEV	100287551,3306,3312	HSPA8P8,HSPA2,HSPA8
335	SLLPVDIRQYL	6773	STAT2
336	YLPTFFLTV	54898	ELOVL2
337	TLLAAEFLKQV	100288772,10574	CCT7P2,CCT7
338	KLFDSDPITVTV	1191	CLU
339	RLISKFDTV	1977	EIF4E
340	KVFDEVIEV	8908	GYG2

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
341	YLAIGIHEL	3034	HAL
342	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
343	LLLPDYYLV	27044	SND1
344	VYISSLALL (A*24)	10213	PSMD14
345	SYNPLWLRI (A*24)	259266	ASPM
346	LYQILQGIVF (A*24)	983	CDK1
347	ALNPADITV	51497	TH1L
348	AYKPGALTF	84883	AIFM2

La presente invención además concierne en general a los péptidos conformes con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como, por ejemplo, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto, cáncer de riñón, cáncer cerebral y/o leucemias.

Se prefiere especialmente el péptido –solo o en combinación– conforme con la presente invención que consiste en la SEQ ID N.º 255. Más preferibles aún es el péptido de la SEQ ID N.º 255 (véase la Tabla 1), preferiblemente para la unión a A*02 y sus usos en la inmunoterapia contra el CHC, el cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia, pero preferiblemente el CHC.

Tal y como muestran a continuación las tablas 5A y B, muchos de los péptidos acordes con la presente invención también pueden ser utilizados para la inmunoterapia en otras indicaciones. Las tablas muestran los péptidos seleccionados de los cuales se ha hallado sobrepresentación (incluida la presentación específica) en tipos adicionales de tumores en más del 5% de las muestras tumorales cuantificadas, o bien que en más del 5% de las muestras tumorales la relación entre las medias geométricas de la presentación observada en los tejidos tumorales con respecto a los tejidos normales era superior a 3. La sobrepresentación se define como una presentación más alta en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal con mayor presentación. Los tejidos normales utilizados para la comparación de la sobrepresentación son los siguientes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, células sanguíneas, vaso sanguíneo, médula ósea, encéfalo, cartílago, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón,

ganglio linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroides, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroides, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

Tabla 5A: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
1	VMAPFTMTI	Páncreas
6	KLSPTVVGL	Colon, recto
10	SLLEEFDFHV	Riñón
14	ALADLTGTVV	Riñón, cerebro, páncreas
15	LLYGHTVTV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
16	SLLGGNIRL	Cerebro, colon, recto
17	RVAS*PTSGV	Cerebro
22	RIAGIRGIQGV	Riñón, colon, recto
26	SLLHTIYEV	Colon, recto
30	YLGEGPRMV	Colon, recto, LLC
34	SLAEGTATV	Colon, recto
36	ILNVDGLIGV	Riñón, cerebro, colon, recto
39	ALDPKANFST	Riñón, cerebro
41	ALLELDEPLVL	Páncreas
43	ALLGVWTSV	Páncreas
47	FLDTPIAKV	Cerebro, colon, recto
51	GLAEELVRA	Cerebro
54	GLLDPNVKSIFV	Riñón, cerebro
55	GLYGRTIEL	Riñón
58	ILADLNLSV	Páncreas
59	ILADTFIGV	Colon, recto, páncreas
60	ILSPLSVAL	Riñón, páncreas
65	KLFSGDELLEV	Cerebro, colon, recto
69	KLLDEVTYLEA	Colon, recto
70	KLLDLETERILL	Colon, recto
72	KLSEAVTSV	Riñón
77	LLHEENFSV	Riñón, colon, recto
80	LLYEGKLTL	Colon, recto
81	NLASFIEQVAV	Riñón, colon, recto, páncreas
88	RLIDRIKTV	Cerebro, colon, recto

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
90	RLLDVLAPLV	Riñón
96	SLLEEPNVIRV	Riñón
101	SLWEGGVRGV	Cerebro
112	VLGEVKVGV	Riñón
116	WVIPAISAV	Riñón
119	YLDKNLTVSV	Riñón
121	YLITGNLEKL	Riñón, colon, recto, páncreas
123	YLWDLDHGFAGV	Cerebro, colon, recto
125	ALYGRLEVV	Cerebro, colon, recto
127	VLIGSNHSL	Colon, recto
133	ALLEMDARL	Riñón, cerebro, colon, recto
134	ALLETNPYLL	Cerebro
135	ALLGKIEKV	Cerebro, páncreas
137	ALPTVLVGV	Riñón, cerebro, colon, recto
138	ALSQVTLLL	Riñón
139	ALSSKPAEV	Colon, recto, páncreas
141	AMGEKSFSV	Cerebro
144	FIQLITGV	Páncreas
147	GLAPGGLAVV	Cerebro
148	GLFAPLVFL	Riñón
161	RLLDEQFAV	Cerebro
166	SILDIVTKV	Cerebro
169	SLFEWFHPL	Riñón, cerebro, colon, recto
170	SLHNGVIQL	Riñón
172	SLLNFLQHL	Riñón, colon, recto, LLC
173	SLTSEIHFL	LLC
176	TLGQIWDV	Cerebro, colon, recto, páncreas
177	VLDEPYEKV	Riñón
179	YIHNILYEV	Cerebro
181	YLLEKFVAV	Colon, recto
184	VVLDGGQIVTV	Cerebro
186	VLLAQIIQV	Riñón, cerebro, colon, recto
187	SYPTFFPRF	Riñón, cerebro
189	AFSPDSHYLLF	Riñón, cerebro
191	KYPDIISRI	Cerebro
192	SYITKPEKW	Riñón, cerebro
193	IYPGAFVDL	Cerebro
194	QYASRFVQL	Cerebro
195	RYAPPPSFSEF	Cerebro

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
196	AYLKWISQI	Cerebro
197	RWPKKSAEF	Riñón, cerebro
198	LYWSHPRKF	Riñón
199	KFVTVQATF	Cerebro
203	YYGILQEKI	Riñón, cerebro
206	KWPETPLLL	Riñón, cerebro
208	SYNPAENAVLL	Cerebro
214	IYVTSIEQI	Cerebro
219	GVMAGDIYSV	Riñón
220	SLLEKELESV	Cerebro
221	ALCEENMRGV	Riñón, cerebro, colon, recto
223	FLFNTENKLLL	Colon, recto
224	ALASVIKEL	Cerebro
229	KMFESFIESV	Riñón, cerebro, colon, recto
230	VLTEFTREV	Riñón, cerebro, colon, recto
231	RLFNDPVAMV	Cerebro, colon, recto
232	KLAEIVKQV	Colon, recto
233	ALLGKLDAI	Riñón, colon, recto
234	YLEPYLKEV	Riñón, cerebro, colon, recto
236	ALADKELLPSV	Riñón, colon, recto, páncreas
237	ALRGEIETV	Colon, recto
238	AMPPPPPQGV	Cerebro, colon, recto
239	FLLGFIPAKA	Cerebro
240	FLWERPTLLV	LLC
244	KIAELLENV	Cerebro, colon, recto
245	KLGAVFNQV	Cerebro
247	KLLDTMVDTFL	Colon, recto
248	KLNDLIQRL	Páncreas
249	LLLGERVAL	Colon, recto
250	NLAEVVERV	Cerebro, colon, recto, LLC
251	RLFADILNDV	Cerebro, colon, recto
255	SLFGQDVKAV	Riñón, cerebro, colon, recto
258	SLMGPVVHEV	Cerebro
259	TLITDGMRSV	Cerebro
260	TLMDMRLSQV	Riñón, cerebro, colon, recto
261	VLFQEALWHV	Colon, recto
266	SLLESNKDLLL	Colon, recto
268	KLYQEVEIASV	Cerebro
269	YLMEGSYNKV	Cerebro, colon, recto

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
270	SVLDQKILL	Riñón, cerebro
271	LLLDKLILL	Cerebro, colon, recto
272	QQLDSKFLEQV	Riñón, cerebro
274	ALAEALKEV	Colon, recto
275	ALIEGAGILL	Riñón, colon, recto, páncreas
276	ALLEADVNIKL	Páncreas
277	ALLEENSTPQL	Riñón
278	ALTSVVVTL	Riñón, cerebro
279	ALWTGMHTI	Riñón, cerebro
281	GLLAGDRLVEV	Riñón
282	GQFPSYLETV	Riñón, cerebro, colon, recto
283	ILSGIGVSQV	Páncreas
285	KLLDLSDSTSV	Riñón, colon, recto
286	KVLDKVFRA	Páncreas
287	LIGEFLEKV	LLC
288	LLDDSLVSI	Páncreas
289	LLLEEGGLVQV	Riñón, colon, recto, páncreas
290	NLIDLDDLYV	Cerebro, colon, recto, páncreas
291	QLIDYERQL	Riñón, colon, recto, páncreas
292	RIPAYFVTV	Riñón
293	FLASESLIKQI	Cerebro, colon, recto
295	SLFSSPPEI	Riñón, cerebro
296	SLLSGRISTL	Riñón
297	TLFYSLREV	Riñón, cerebro, colon, recto
299	ALLRVTPFI	LLC
300	TLAQQPTAV	Páncreas
301	VLADFGARV	Riñón, colon, recto
302	KIQEILTQV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas, LLC
304	SLIDQFFGV	Cerebro, colon, recto, páncreas
305	GVLENIFGV	Riñón, cerebro
306	KLVEFDFLGA	Cerebro, colon, recto
308	ALLRTVVSV	Riñón, páncreas
309	GLIEIISNA	Cerebro
310	SLWGGDVVL	Cerebro, colon, recto
311	FLIPIYHQV	Riñón, cerebro
312	RLGIKPESV	Cerebro
313	LTAPPEALLMV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
315	KVLDGSPIEV	Riñón
316	LLREKVEFL	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos/tipos de cáncer relevantes
317	KLPEKWESV	Cerebro, colon, recto, páncreas
319	KLFNEFIQL	Riñón, cerebro, colon, recto
321	GVIAEILRGV	Riñón, cerebro
324	RLFETKITQV	Riñón
325	RLSEAIVTV	Cerebro, páncreas
326	ALSDGVHKI	Páncreas
327	GLNEEIARV	Cerebro, colon, recto
328	RLEEDDGDVAM	Riñón, cerebro, colon, recto
329	SLIEDLILL	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas
330	SMSADVPLV	Cerebro, colon, recto
331	SLLAQNTSWLL	Cerebro, colon, recto, páncreas
332	AMLAVLHTV	Cerebro, colon, recto
333	GLAEDIDKGEV	Riñón, cerebro
334	SILTIEDGIFEV	Riñón, cerebro, colon, recto, páncreas, LLC
335	SLLPVDIRQYL	Riñón, LLC
336	YLPTFFLTV	Riñón, cerebro
337	TLLAAEFLKQV	Cerebro
338	KLFDSDPITVTV	Cerebro
339	RLISKFDTV	Cerebro
340	KVFDEVIEV	Cerebro
342	AMSSKFFLV	Cerebro, colon, recto, páncreas
343	LLLPDYYLV	Cerebro, páncreas
344	VYISSLALL (A*24)	Cerebro
345	SYNPLWLRI (A*24)	Cerebro
346	LYQILQGIVF (A*24)	Riñón
347	ALNPADITV	Cerebro

Tabla 5B: Péptidos acordes con la presente invención y sus usos específicos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas - S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
189	AFSPDSHYLLF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata
273	AILETAPKEV	Cáncer de esófago

236	ALADKELLPSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
14	ALADLTGTVV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de páncreas
38	ALADVVHEA	Cáncer de mama, cáncer de ovario
274	ALAEALKEV	Cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
9	ALANQKLYSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer colorrectal, cáncer de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
224	ALASVIKEL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, Melanoma
221	ALCEENMRGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma
131	ALDSGAFQSV	Cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
185	ALFPALRPGGFQA	Cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
275	ALIEGAGILL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
276	ALLEADVNIKL	Cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de ovario

277	ALLEENSTPQL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
133	ALLEMDARL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
134	ALLETNPYLL	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
135	ALLGKIEKV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
233	ALLGKLDAI	leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
43	ALLGVWTSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de páncreas
227	ALLKVNQEL	Melanoma, cáncer de útero
136	ALLNQHYQV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
299	ALLRVTPFI	Linfoma no hogdkiniano, cáncer de ovario
32	ALNAVRLLV	Cáncer de pulmón microcítico
267	ALNENINQV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, cáncer de células de Merkel, Melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma

137	ALPTVLVGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
45	ALQDQLVLV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral
237	ALRGEIETV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
139	ALSSKPAEV	Cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de útero
278	ALTSVVVTL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
279	ALWTGMHTI	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
125	ALYGRLEVV	Cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
141	AMGEKSFSV	Melanoma
238	AMPPPPPQGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
342	AMSSKFFLV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga

		urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
280	ATLNIIHSV	Cáncer de vejiga urinaria
226	AVLGPLGLQEV	Cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario
202	AYGTYRSNF	Cáncer de pulmón amicrocítico
196	AYLKWISQI	Cáncer de pulmón amicrocítico
210	AYPAIRYLL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico
144	FIQLITGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer cerebral, cáncer de vejiga urinaria
293	FLASESLIKQI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
47	FLDTPIAKV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer de esófago
223	FLFNTENKLLL	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
145	FLIAEYFEHV	Cáncer de pulmón microcítico
239	FLLGFIPAKA	Cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
128	GLAFSLNGV	Melanoma, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
147	GLAPGGLAVV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
148	GLFAPLVFL	Cáncer de esófago, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano

242	GLFAPVHKV	Cáncer de vejiga urinaria
52	GLFNAELLEA	Cáncer de pulmón microcítico
281	GLLAGDRLVEV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
243	GLLDNPELRV	Cáncer de vejiga urinaria
54	GLLDPNVKSIFV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
149	GLLSGLDIMEV	Cáncer de pulmón microcítico
150	GLSNLGIKSI	Cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
55	GLYGRTIEL	Cáncer de pulmón microcítico
282	GQFPSYLETV	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
219	GVMAGDIYSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
151	HLAKVTAEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
57	HLTEAIQYV	Linfoma no hogdkiniano
58	ILADLNLSV	Cáncer de mama
59	ILADTFIGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
36	ILNVDGLIGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero,

		cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
283	ILSGIGVSQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
216	IYADVGEEF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer de próstata
211	IYIPSYFDF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer cerebral, Cáncer gástrico
207	IYLERFPIF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico
193	IYPGAFVDL	Cáncer de pulmón amicrocítico
214	IYVTSIEQI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales
244	KIAELLENV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
62	KIAGTNAEV	Cáncer de mama
63	KIDEKNFVV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
64	KILEETLYV	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
302	KIQEILTQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas

232	KLAEIVKQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
284	KLDAFVEGV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
152	KLDNNLDSV	Cáncer de mama, Melanoma
235	KLFEEIREI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer colorrectal, Melanoma, cáncer de vejiga urinaria
245	KLGAVFNQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
246	KLISSYYNV	Cáncer de ovario
69	KLLDEVTYLEA	Cáncer de vejiga urinaria
70	KLLDLETERILL	Cáncer de ovario, cáncer de útero
285	KLLDLSDSTSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de útero
247	KLLDTMVDTFL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer cerebral, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
8	KLLEEATISV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
248	KLNDLIQRL	Cáncer gástrico, cáncer de útero
20	KLSNVLQQV	Cáncer de pulmón microcítico
6	KLSPTVVGL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario
154	KLTDHLKYV	Cáncer de pulmón microcítico
268	KLYQEVEIASV	Cáncer colorrectal, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria

225	KMDPVAYRV	Cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
229	KMFESFIESV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
286	KVLDKVFRA	Cáncer colorrectal, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
206	KWPETPLLL	Cáncer gástrico
191	KYPDIISRI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico
287	LIGEFLEKV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
288	LLDDSLVSI	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
156	LLFPHPVNQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
77	LLHEENFSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
78	LLIDDEYKV	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
271	LLLDKLILL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
289	LLLEEGGLVQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano

249	LLLGERVAL	Cáncer de ovario
37	LLLPLLPPLSP	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de células de Merkel, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
80	LLYEGKLTL	Cáncer de ovario
15	LLYGHTVTV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
222	LTDITKGV	Cáncer de mama, linfoma no hogdkiniano
346	LYQILQGIVF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer cerebral, cáncer gástrico
198	LYWSHPRKF	Cáncer de pulmón amicrocítico
250	NLAEVVERV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
81	NLASFIEQVAV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
290	NLIDLDDLYV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de células de Merkel, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
291	QLIDYERQL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
157	QLLPNLRAV	Cáncer de células renales
272	QQLDSKFLEQV	Cáncer de células de Merkel, cáncer de ovario, linfoma no hogdkiniano

194	QYASRFVQL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico
22	RIAGIRGIQGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, linfoma no hogdkiniano
292	RIPAYFVTV	Cáncer gástrico, cáncer de mama, melanoma, linfoma no hogdkiniano
86	RLAAFYSQV	Leucemia mieloide aguda
251	RLFADILNDV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
231	RLFNDPVAMV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
294	RLIDLHTNV	Cáncer de esófago
88	RLIDRIKTV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
89	RLIEEIKNV	Cáncer de pulmón microcítico
161	RLLDEQFAV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama
90	RLLDVLAPLV	Cáncer de mama
91	RLPDIPLRQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
92	RLPPDTLLQQV	Cáncer de vejiga urinaria
23	RLYDPASGTISL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, linfoma no hogdkiniano
164	RMLIKLLEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal
94	RMSDVVKGV	Cáncer de mama, cáncer de ovario
252	RTIEYLEEV	Melanoma

17	RVAJPTSGV	Leucemia mieloide aguda
197	RWPKKSAEF	Cáncer de pulmón amicrocítico
195	RYAPPPSFSEF	Cáncer de pulmón amicrocítico
190	RYNEKCFKL	Cáncer de pulmón amicrocítico
95	SICNGVPMV	Cáncer de vejiga urinaria
166	SILDIVTKV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
24	SLAEEKLQASV	Cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria
169	SLFEWFHPL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
255	SLFGQDVKAV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
256	SLFQGVEFHYV	Cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, Cáncer de células de Merkel, linfoma no hogdkiniano
295	SLFSSPPEI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
170	SLHNGVIQL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
331	SLLAQNTSWLL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, cáncer gástrico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria

10	SLLEEFDFHV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de útero
96	SLLEEPNVIRV	Melanoma, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
257	SLLEKAGPEL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario
220	SLLEKELESV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
266	SLLESNKDLLL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, cáncer de útero
16	SLLGGNIRL	Cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de páncreas
26	SLLHTIYEV	Cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, linfoma no hogdkiniano
172	SLLNFLQHL	Leucemia mieloide aguda
97	SLLPQLIEV	Cáncer de pulmón microcítico
296	SLLSGRISTL	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria
258	SLMGPVVHEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
35	SLQESILAQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, Leucemia mieloide aguda

99	SLSAFLPSL	Cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
11	SLSQELVGV	Cáncer cerebral, melanoma, cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
173	SLTSEIHFL	Cáncer de útero, linfoma no hogdkiniano
101	SLWEGGVRGV	Melanoma
103	SMGDHLWVA	Cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
330	SMSADVPLV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
129	SQADVIPAV	Cáncer de vejiga urinaria
270	SVLDQKILL	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
104	SVWFGPKEV	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
192	SYITKPEKW	Cáncer de pulmón amicrocítico
208	SYNPAENAVLL	Cáncer de pulmón amicrocítico
345	SYNPLWLRI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, cáncer gástrico
187	SYPTFFPRF	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de próstata
300	TLAQQPTAV	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano

297	TLFYSLREV	Cáncer de mama, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
176	TLGQIWDV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas
259	TLITDGMRSV	Cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas
260	TLMDMRLSQV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
298	TMAKESSIIGV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
110	TVGGSEILFEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
111	TVMDIDTSGTFNV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
209	VFHPRQELI	Cáncer de pulmón amicrocítico
261	VLFQEALWHV	Cáncer de vejiga urinaria
127	VLIGSNHSL	Cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, leucemia mieloide aguda
186	VLLAQIIQV	Melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
262	VLPNFLPYNV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, Melanoma,

		cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
114	VLSQVYSKV	Cáncer de pulmón microcítico
230	VLTEFTREV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
263	VLYPSLKEI	Cáncer de células renales, cáncer de mama, cáncer de útero
1	VMAPFTMTI	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, linfoma no hogdkiniano
264	VMQDPEFLQSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano
115	VVLDDKDYFL	Leucemia linfocítica crónica
344	VYISSLALL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, Cáncer colorrectal
265	WLIEDGKVVTV	Melanoma
117	YAFPKSITV	Cáncer de páncreas
178	YIFTTPKSV	Leucemia mieloide aguda
179	YIHNILYEV	Leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano
341	YLAIGIHEL	Cáncer de pulmón microcítico
234	YLEPYLKEV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de

		ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
30	YLGEGPRMV	Cáncer de pulmón amicrocítico, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
180	YLGPHIASVTL	Melanoma
121	YLITGNLEKL	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma, linfoma no hogdkiniano, cáncer de páncreas
228	YLITSVELL	Cáncer de ovario, linfoma no hogdkiniano
181	YLLEKFVAV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
269	YLMEGSYNKV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de la vesícula biliar, colangiocarcinoma
123	YLWDLDHGFAGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, leucemia mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
31	YQMDIQQEL	Cáncer de pulmón microcítico
203	YYGILQEKI	Cáncer de pulmón amicrocítico
213	YYNKVSTVF	Cáncer de pulmón amicrocítico

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del péptido acorde con la presente invención conforme con la SEQ ID N.º 255 para – en una forma preferida de realización combinada – el tratamiento del cáncer de colon o el cáncer renal.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un péptido acorde con la presente invención conforme con la SEQ ID N.º 255 para – en una forma preferida de realización combinada – el tratamiento del cáncer de riñón.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido acorde con la presente invención conforme con la SEQ ID N.º 255 para – en una forma preferida de realización combinada – el tratamiento del cáncer de cerebro.

De forma similar, los péptidos como los enumerados en la anterior Tabla 5B pueden ser la base –en una forma de realización combinada preferida– para el tratamiento de las enfermedades tal y como se indica.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los péptidos acordes a la presente invención para el tratamiento –preferentemente combinado– de una enfermedad proliferativa seleccionada del grupo siguiente: CHC, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto, y leucemia.

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

La presente invención se refiere, además, a péptidos acordes con la presente invención en que cada uno de dichos péptidos consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 255.

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en particular en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias/inmunopatológicas.

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

La presente invención concierne, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en concreto de TCR solubles (TCRs) y TCR clonados y sintetizados en linfocitos T autólogos o alogénicos, y con métodos para fabricarlos, así como con linfocitos citolíticos naturales

(o células NK) u otro tipo de células que sean portadoras de dichos TCR o reaccionen de forma cruzada con dichos TCR.

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 255, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que

expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos conforme a la presente invención.

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al uso acorde con la presente invención, en que las células cancerosas son células de CHC, de cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia, pero preferiblemente células de CHC.

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

Existen dos tipos de moléculas MHC: Las MHC de clase I y las MHC de clase II. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores MHC de clase II). Su conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos procedentes de la proteólisis mayoritariamente de proteínas endógenas, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) y péptidos grandes. Las moléculas MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan principalmente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC mediante endocitosis y después procesadas por las mismas. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de epítopos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) que sean reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos reviste suma importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que estimulen respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic S, et al. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Jul 22;100(15):8862-7). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Mortara L, et al. CIITA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. Clin Cancer Res. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3435-43) que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células

NK, macrófagos o granulocitos (Hwang ML, et al. Cognate memory CD4+ T cells generated with dendritic cell priming influence the expansion, trafficking, and differentiation of secondary CD8+ T cells and enhance tumor control. J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):5829-38).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como por ejemplo monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con cáncer se ha descubierto que las células del tumor expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel J, et al. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. Clin Cancer Res. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4163-70).

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

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

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores aun sin el concurso de los

linfocitos T CD8-positivos a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN-γ).

Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan directamente como agentes efectores antitumorales (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

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

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, esto es, los epítopos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están regulados al alza en las células del tumor correspondiente.

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

Para desencadenar la respuesta inmunitaria celular el péptido de MHC de clase I ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 12 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados («anclaje») en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de

MHC. De este modo cada alelo MHC posee un “motivo de unión” que determina qué péptidos se pueden unir específicamente a la hendidura de unión.

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

La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores 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 están 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. La especificidad (o asociación) tumoral de un péptido también puede surgir si el péptido procede de un exón del (asociado con) tumor en el caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas con el mismo).

e) TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítopos nuevos en tumores como sucede con MUC1 o de 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 de cuello uterino.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. En una forma de realización preferida, el péptido debe ser presentado en exceso por las células tumorales con respecto a los tejidos sanos

normales. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítopos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

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

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluidas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de linfocitos T que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o están basados en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales.

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T

con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítopo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, en una forma de realización muy preferida de la invención es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos que sean presentados en exceso o de forma selectiva contra los cuales se encuentre un linfocito T funcional y/o proliferativo. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

En el caso de 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.

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

La expresión diferencial de COL18A1 ha sido descrita en el cáncer de vejiga, en tumores rabdoideos y en el carcinoma ovárico, y se ha demostrado que algunos polimorfismos específicos del gen aumentan el riesgo de cáncer de mama esporádico (Fang et al., 2013; Gadd et al., 2010; Peters et al., 2005; Lourenco et al., 2006).

Los cambios en la expresión del gen COPA y en la edición de su ARN parecen estar vinculados con el carcinoma hepatocelular y un estudio experimental reveló efectos antiapoptósicos de COPA en células de mesotelioma (Sudo et al., 2010; Qi et al., 2014; Wong et al., 2003).

La actividad de CPB2 aparece reducida significativamente en la leucemia promielocítica aguda (Meijers et al., 2000).

La CRP, una proteína de fase aguda sintetizada por el hígado, es un marcador pronóstico de diversos tipos de cáncer, entre ellos el carcinoma de células renales y el mieloma múltiple (Ljungberg, 2007; Fassas and Tricot, 2004).

CRYZ es un gen diana del oncosupresor p53 (Bansal et al., 2011). Codifica la proteína zeta-cristalina, la cual interactúa directamente con el ARNm de la molécula antiapoptósica bcl-2 y estabiliza la sobreexpresión de bcl-2 en la leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (Lapucci et al., 2010).

La sobreexpresión de CSRP2 está asociada con la desdiferenciación del carcinoma hepatocelular (Midorikawa et al., 2002).

CYB5A codifica una enzima que desintoxica las moléculas cancerígenas y es un factor pronóstico del cáncer de páncreas (Blanke et al., 2014; Giovannetti et al., 2014).

Los niveles elevados de expresión de CYP27A1 han sido vinculados con el carcinoma de endometrio, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal (Bergada et al., 2014; Nelson et al., 2013; Matusiak and Benya, 2007).

La sobreexpresión del CYP2E1 ha sido descrita en el cáncer colorrectal, en polimorfismos específicos que están asociados con el cáncer de vejiga y de pulmón, así como en células de cáncer de mama . (Ye et al., 2014; Patel et al., 2014; Deng et al., 2014; Leung et al., 2013).

CYP2J2 es una enzima que aparece sobreexpresada en diversos tipos de cáncer humano, como el cáncer de esófago, pulmón, mama, estómago, hígado y colon . (Jiang et al., 2005; Narjoz et al., 2014).

CYP4F8 se expresa intensamente en el cáncer de próstata (Vainio et al., 2011).

CYP4F2 y CYP4F3 aparecen ambos sobreexpresados en el adenocarcinoma ductal de páncreas y el CYP4F2 en el cáncer de ovario (Gandhi et al., 2013; Alexanian et al., 2012).

Se ha demostrado que la expresión de CYP4F11 está regulada por NF-κB y p53 (Kalsotra et al., 2004; Bell and Strobel, 2012; Goldstein et al., 2013).

Las variantes genéticas de CYPAF12 están asociadas significativamente con la respuesta a la gemcitabina en los pacientes con cáncer de páncreas (Goldstein et al., 2013; Harris et al., 2014).

Los niveles elevados de DAP3 aparecen correlacionados con respuestas más favorables a la quimioterapia en el cáncer gástrico y un mejor resultado clínico en el cáncer de mama, pero por la otra se ha descrito su sobreexpresión en tumores oncocíticos de la tiroides y en el glioblastoma invasivo(Jia et al., 2014; Wazir et al., 2012; Jacques et al., 2009; Mariani et al., 2001).

PEX19 es esencial para la biogenia de los peroxisomas, pero también parece interactuar directamente con p19ARF, lo que en última instancia conduce a la retención de este factor en el citoplasma y a la inactivación de la función oncosupresora de p53 (Sugihara et al., 2001).

DDX11, perteneciente a la familia DEAH de las helicasas de ADN, se expresa fuertemente en el melanoma avanzado (Bhattacharya et al., 2012).

NME4 es una nucleósido difosfato-cinasa que aparece sobreexpresada en el cáncer de colon y gástrico, así como en el síndrome mielodisplásico, en esta última enfermedad asociada con un pronóstico malo (Kracmarova et al., 2008; Seifert et al., 2005).

DENND5B actúa como factor de intercambio de GDP-GTP para activar a las Rab-GTPasas (Yoshimura et al., 2010).

DIEXF media en la degradación no proteosómica del oncosupresor p53 (Tao et al., 2013).

DOCK7 es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que aparece sobreexpresado en el glioblastoma y que aumenta la invasión de las células del mismo en respuesta al factor HGF al activar a Rac-1 (Murray et al., 2014).

En estirpes celulares de carcinoma hepatocelular, DRG2 ha demostrado estar regulado a la baja durante la apoptosis inducida por los antineoplásicos, y su sobreexpresión inhibe la apoptosis provocada por la doxorrubicina en tales células (Chen et al., 2012a).

DROSHA, una de las dos enzimas críticas en la biosíntesis de los microARN, aparece sobreexpresada en diversos tipos de cáncer como los tumores gastrointestinales, el cáncer de mama y el de cuello uterino y parece estimular la proliferación, la formación de colonias y la migración de las células tumorales (Avery-Kiejda et al., 2014; Havens et al., 2014; Zhou et al., 2013b).

Polimorfismos mononucleotídicos del gen DUSP14 están vinculados con un riesgo de melanoma anómalo (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013b).

Un estudio de secuenciación del exoma entero descubrió mutaciones somáticas en el gen DYNC1H1 en pacientes con neoplasia mucinosa papilar intraductal del páncreas (Furukawa et al., 2011).

La proteína EEF2 aparece sobreexpresada en el cáncer de pulmón, de esófago, páncreas, mama y próstata, en el glioblastoma multiforme y en el linfoma no hodgkiniano, y actúa como oncógeno en el crecimiento de las células cancerosas (Oji et al., 2014; Zhu et al., 2014a).

Se han detectado mutaciones del gen EFR3A en muestras de adenoma colorrectal (Bojjireddy et al., 2014; Zhou et al., 2013a).

EIF2B5 codifica una subunidad del factor B de iniciación de la traducción. En este gen se han descrito polimorfismos mononucleotídicos que se han vinculado con el tiempo de supervivencia en el cáncer de ovario (Goode et al., 2010).

EIF3A, la subunidad A del factor 3 de inicio de la traducción eucariota, está sobreexpresado en los tumores de mama, pulmón, cuello de útero, esófago, estómago y colon, y se ha demostrado su intervención en la regulación del ciclo celular (Dong and Zhang, 2006).

EIF4E es un potente oncogén que aparece elevado hasta en el 30% de las neoplasias malignas humanas, entre ellas los carcinomas de mama, próstata, pulmón, cabeza y cuello, así como en muchas leucemias y linfomas.

ELOVL2 se ha demostrado su sobreexpresión en el carcinoma hepatocelular (Jakobsson et al., 2006; Zekri et al., 2012).

EPRS codifica una aminoacil-ARNt-sintetasa multifuncional, que ha sido descrita como un antígeno asociado a tumor en el cáncer de colon (Line et al., 2002).

La actividad del promotor del EXOSC4 aumenta en el carcinoma hepatocelular, debido a la hipometilación del ADN. EXOSC4 inhibe de forma eficaz y específica el crecimiento de las células cancerosas y la capacidad invasiva celular (Drazkowska et al., 2013; Stefanska et al., 2014).

La enzima hidrolítica FUCA2 resulta ser esencial para la adhesión de *Helicobacter pylori* a las células de cáncer gástrico humanas. (Liu et al., 2009a).

GABRQ codifica la subunidad theta del receptor GABAA. El GABA estimula el crecimiento del carcinoma hepatocelular humano mediante la sobreexpresión de la subunidad theta del receptor GABAA (Li et al., 2012).

En el carcinoma de células escamosas se ha descrito que la sobreexpresión de GALNT2 refuerza el potencial invasivo de las células tumorales mediante la modificación de la O-glucosilación y la actividad del EGFR (Lin et al., 2014; Hua et al., 2012a; Wu et al., 2011).

Los niveles altos de GGH han sido asociados con la resistencia celular a los antifolatos, en particular contra el metotrexato y con un pronóstico malo en el cáncer de mama invasivo y en los tumores endocrinos pulmonares (Schneider and Ryan, 2006; Shubbar et al., 2013; He et al., 2004).

GLUL aparece sobreexpresado en las células del carcinoma de mama humano y en los astrocitomas (Zhuang et al., 2011; Collins et al., 1997; Christa et al., 1994; Cadoret et al., 2002).

Se ha descrito a GNPAT como implicado en la inhibición del crecimiento y en la inducción de la apoptosis en el melanoma metastásico (Ofman et al., 2001; Qin et al., 2013).

Se han descrito deleciones en la región cromosómica del GOLGA4 en el carcinoma del cuello uterino y la fusión «en marco» del ARNm del GOLGA4 con el del PDGFRB en neoplasias mieloproliferativas (Senchenko et al., 2003; Hidalgo-Curtis et al., 2010).

GPAM se expresa en el cáncer de mama humano, donde está asociado con cambios en el metabolismo celular y una mejor supervivencia global (Brockmoller et al., 2012).

La elevación de los niveles de GPT en el suero aumenta supuestamente el riesgo de cáncer gastrointestinal y está asociada con la carcinogenia y la recurrencia del carcinoma hepatocelular inducido por el virus de la hepatitis C (Kunutsor et al., 2014; Tarao et al., 1997; Tarao et al., 1999).

Se ha demostrado que la GRB14 aparece regulada al alza en el cáncer de mama, donde la expresión elevada estuvo asociada significativamente con mejor supervivencia sin enfermedad y global (Huang et al., 2013; Balogh et al., 2012).

Se han descrito polimorfismos mononucleotídicos en el gen GTF2H4 que incrementarían el riesgo de cáncer de pulmón vinculado con el tabaquismo y del cáncer de cuello uterino inducido por el virus del papiloma (Mydlikova et al., 2010; Buch et al., 2012; Wang et al., 2010).

Diversos estudios parecen atribuir una función importante del HSPA2 en la progresión de la enfermedad del cáncer de cuello uterino, el carcinoma de células renales y el cáncer de vejiga urinaria. Algunos polimorfismos de este gen están asociados con el desarrollo del cáncer gástrico (Singh and Suri, 2014; Ferrer-Ferrer et al., 2013; Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b).

HSPA8 aparece sobreexpresado en el carcinoma epidermoide esofágico. Asimismo, HSPA8 aparece sobreexpresado en el mieloma múltiple y en el carcinoma de colon, y la expresión inducida por el BCR-ABL1 del HSPA8 promueve la supervivencia celular en la leucemia mieloide crónica (Dadkhah et al., 2013; Wang et al., 2013a; Chatterjee et al., 2013; Kubota et al., 2010; Jose-Eneriz et al., 2008).

MDN1 ha sido descrito como un candidato a gen oncosupresor, que aparece mutado en los tumores de mama del tipo luminal B (Cornen et al., 2014).

MIA3, también llamada proteína 1 de organización del Golgi y de transporte (TANGO), aparece regulada a la baja en los carcinomas de colon y hepatocelular, y desempeña un papel oncosupresor en ambas entidades (Arndt and Bosserhoff, 2007). En cambio, un estudio sobre el carcinoma epidermoide oral indica la relación de la expresión de MIA3 con la progresión tumoral, la formación de metástasis y el estadio clínico, lo cual apunta hacia un efecto oncógeno del mismo (Sasahira et al., 2014).

CPSF6 ha sido identificado como un gen componente del «casete génico preparado» (*Poised gene cassette*, PGC) asociado con diferencias significativas en el potencial invasivo y metastásico de varios tipos de tumores, como el cáncer de mama, colon, hígado, pulmón, esófago y tiroides (Yu et al., 2008).

Se ha descrito que los bajos niveles de expresión de MPDZ están asociados con un mal pronóstico en las pacientes con cáncer de mama (Martin et al., 2004).

NAA35, también llamado MAK10, codifica la subunidad auxiliar NatC de la N(alfa)-acetil-transferasa 35. En pacientes con carcinoma epidermoide esofágico se ha detectado un ARN quimérico GOLM1-MAK10 altamente expresado en el cáncer, que codifica una proteína de fusión segregada que podría servir como marcador molecular (Zhang et al., 2013b).

Se ha demostrado que NAV2 se expresa específicamente en un grupo de tumores de colon y el tratamiento de células de ese tipo de cáncer con oligonucleótidos antisentido contra NAV2 indujo su apoptosis (Ishiguro et al., 2002).

La sobreexpresión de NCSTN es indicadora de una peor supervivencia global en las pacientes con cáncer de mama negativo para el receptor de estrógenos y se han detectado niveles elevados de nicastrina y de Notch4 en células de cáncer de mama resistente a hormonoterapia, en que la activación desemboca en un comportamiento invasivo (Sarajlic et al., 2014; Lombardo et al., 2014).

En el cáncer de pulmón amicrocítico la proteína NKD1 aparece reducida, pero su ARNm aparece elevado, estando lo primero relacionado con el incremento del potencial invasivo y con un mal pronóstico (Zhang et al., 2011). El ARNm de la NKD1 también se halla elevado en células de tumores de colon humanos (Yan et al., 2001; Zhang et al., 2011).

En el cáncer de esófago se ha descrito su asociación con la metástasis ganglionar, mientras que su sobreexpresión en el cáncer de próstata propiciaría un bloqueo de la división celular (Hatakeyama et al., 2006; Lin et al., 2004).

Un estudio que investigaba el papel de la vía de señalización Notch en el cáncer de ovario describió una mayor frecuencia de expresión del RFNG en el adenoma respecto al carcinoma (Gu et al., 2012; Hopfer et al., 2005).

RINT1 ha sido descrito como oncogén en el glioblastoma multiforme y como un gen de sensibilidad al cáncer moderadamente penetrante en el cáncer de mama, así como en cánceres relacionados con el síndrome de Lynch (Ngeow and Eng, 2014; Quayle et al., 2012).

Se ha hallado que la expresión elevada de RORC está vinculada con una supervivencia sin metástasis más larga en el cáncer de mama. La expresión atenuada de RORC en adenomas somatotrofos está relacionada con el aumento del tamaño tumoral y con una respuesta clínica mermada al tratamiento con somatostatina (Cadenas et al., 2014; Lekva et al., 2013).

Se ha descrito que RPL17 promueve la multirresistencia farmacológica al suprimir la apoptosis estimulada por los fármacos (Shi et al., 2004b).

Se ha descrito el aumento de la expresión de RPS29 en el cáncer gástrico y colorrectal (Takemasa et al., 2012; Sun et al., 2005).

SAMM50 codifica un componente de la Maquinaria de clasificación y montaje (SAM, *Sorting and Assembly Machinery*) de la membrana externa mitocondrial, que interviene en el montaje de las proteínas con barriles beta en dicha membrana. Se ha detectado un ARNm quimérico promotor del crecimiento (SAMM50-PARVB) en células de cáncer de mama y de ovario, así como en diversas muestras de cáncer de mama, estómago, colon, riñón y útero (Plebani et al., 2012).

SERPINF2 codifica el inhibidor principal de la plasmina, que degrada la fibrina y otras proteínas. El nivel plasmático del complejo inhibidor de la plasmina/alfa-2-plasmina ha demostrado ser un predictor de la supervivencia en el carcinoma de pulmón amicrocítico y se ha observado la baja actividad de la alfa-2-antiplasmina en la sangre de pacientes con carcinoma prostático (Zietek et al., 1996; Taguchi et al., 1996).

La sobreexpresión de SF3B3 está correlacionada significativamente con la supervivencia global y la hormonorresistencia en el cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos (Gokmen-Polar et al., 2014).

Los niveles de la proteína SHC1 aparecen elevados en el cáncer de próstata, en el de mama metastásico, en el de ovario y en el de tiroides, y se cree que diversas isoformas actúan como proteína adaptadora primaria que media las señales mitógenas de los esteroides a nivel no genómico (Alam et al., 2009; Rajendran et al., 2010).

AMACR es usado como biomarcador en el cáncer el próstata puesto que aparece notablemente sobreexpresado en esta entidad (Wu et al., 2014). Asimismo, ha sido usado como marcador inmunohistoquímico para el diagnóstico del carcinoma de células renales (Ross et al., 2012).

Datos experimentales apuntan a que la expresión de C1QTNF3 podría intervenir en el crecimiento tumoral del osteosarcoma, asociado con la activación de la vía de señalización de ERK1/2 y que es una nueva adipocina antiapoptósica que protege a las células madre mesenquimáticas de la apoptosis inducida por la privación de suero/hipoxia a través de la vía de señalización de PI3K/Akt (Hou et al., 2014; Akiyama et al., 2009).

GPC3 se expresa en la mayoría de los carcinomas hepatocelulares. En estos momentos se están estudiando dos estrategias terapéuticas contra el CHC que tienen como diana el GPC2 en ensayos clínicos de fase II: Un anticuerpo monoclonal humanizado anti-

GPC3 y una vacuna que consiste en dos péptidos derivados del GPC3. Los péptidos usados en el segundo estudio son distintos del péptido presentado en el presente documento. La expresión de GPC3 también ha sido detectada en todos los tumores del saco vitelino, algunos carcinomas epidermoides de pulmón y en carcinomas de células claras del ovario (Filmus and Capurro, 2013; Kandil and Cooper, 2009).

MAGEB2 está clasificado como un antígeno de cáncer-testículo, puesto que se expresa en los testículos y en la placenta, así como en una fracción significativa de tumores de diversos tipos histológicos, entre ellos el mieloma múltiple y el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Pattani et al., 2012; Van et al., 2011).

MAPKAPK5 codifica un oncosupresor y es miembro de la familia de las serina/treonina-cinasas. MAPKAPK5 aparece infraexpresada en el cáncer colorrectal, lo que provoca un aumento de la actividad de la oncoproteína myc y un descenso de la formación tumoral al suprimir la actividad oncogénica de ras en un modelo de cáncer hematopoyético en ratón (Yoshizuka et al., 2012; Kress et al., 2011).

La sobreexpresión de USP14 está asociada con el aumento de la proliferación de las células tumorales y con un pronóstico malo en el cáncer de ovario epitelial, el cáncer de pulmón amicrocítico y el cáncer colorrectal (Wang et al., 2015; Wu et al., 2013a; Shinji et al., 2006).

C4A ha sido descrito como biomarcador del síndrome de ovario poliquístico y del cáncer endometrial, y los datos experimentales apuntan a que C4 puede mediar en el crecimiento tumoral (Galazis et al., 2013; Rutkowski et al., 2010).

Se ha descrito su sobreexpresión en carcinomas epidermoides orales positivos para el papilomavirus humano 18 y ha sido identificado como *locus* de sensibilidad al cáncer de próstata (Lo et al., 2007; Nwosu et al., 2001).

Los polimorfismos mononucleotídicos del gen CFHR5 están asociados con la supervivencia sin progresión en el linfoma folicular (Charbonneau et al., 2012).

CLIP1 codifica la proteína de enlace 1 portadora de dominio CAP-GLY, que liga las vesículas endocíticas a los microtúbulos. Este gen aparece fuertemente expresado en las células de Reed-Sternberg del linfoma de Hodgkin y en el cáncer de mama, y parece estar implicado en la migración y la invasión de las células de cáncer de mama y cáncer de páncreas (Sun et al., 2013; Suzuki and Takahashi, 2008; Li et al., 2014a; Sun et al., 2012).

CLU inhibiría la progresión tumoral, mientras que en la neoplasia avanzada parece conferir una supervivencia sustancialmente mayor al tumor al suprimir muchos factores estresantes terapéuticos y potenciar la metástasis. Se ha demostrado que CLU desempeña un papel crítico en la patogenia del cáncer de próstata, al regular el comportamiento agresivo de las células del carcinoma de células renales claras humano a través de la modulación de la señalización del ERK1/2 y de la expresión de la MMP-9 y conferir resistencia al tratamiento en los estadios avanzados del cáncer de pulmón (Trougakos, 2013; Panico et al., 2009; Takeuchi et al., 2014; Wang et al., 2014).

Se ha descrito que el gen de fusión SEC16A-NOTCH1 es un primer gen de fusión recurrente en el cáncer de mama (Edwards and Howarth, 2012).

En el cáncer de próstata y en el de cuello uterino se ha observado la deleción recurrente del gen SHQ1, de lo que se deduce su papel como oncosupresor (Krohn et al., 2013; Lando et al., 2013).

En los carcinomas de células renales claras y en el cáncer de vejiga la expresión elevada de SLC16A1 ha sido vinculada con factores de pronóstico negativo y anticipa la progresión del tumor. En el cáncer colorrectal los polimorfismos mononucleotídicos del gen SLC16A1 podrían influir en los resultados clínicos y pueden ser usados para predecir

la respuesta a la quimioterapia adyuvante (Kim et al., 2015; Fei et al., 2014a; Fei et al., 2014a).

Está demostrado que el glioblastoma libera glutamato en grandes cantidades, lo que tal vez estimule la proliferación de las células tumorales y facilite la invasión tumoral, a la par que regula a la baja el SLC1A2, lo cual está correlacionado con un grado del tumor más alto, de lo que se deduce su posible papel en la progresión de los tumores gliales. Asimismo, en el cáncer gástrico se ha detectado un gen de fusión del SLC1A2 con el CD44 que podría constituir una clase de fusión génica que crearía un medio metabólico propicio para la oncogenia que favorecería el crecimiento y la supervivencia del tumor (Tao et al., 2011; de Groot et al., 2005).

La expresión elevada de SLC3A2 está asociada con el crecimiento tumoral, la agresividad biológica y la supervivencia de los pacientes con cáncer de las vías biliares y contribuye significativamente al pronóstico negativo de los pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico mediante la proliferación celular a través de la vía de PI3K/Akt. Asimismo, la sobreexpresión del SLC3A2 junto con la de las integrinas ß1 y ß3 y de Fak está asociada con la progresión y las metástasis hepáticas del cáncer colorrectal (Kaira et al., 2014; Fei et al., 2014b; Sun et al., 2014).

Existen indicios de la implicación del SLC9A3R1 en el desarrollo tumoral en el carcinoma hepatocelular, el schwannoma, el glioblastoma, el cáncer colorrectal y, especialmente, en el cáncer de mama (Saponaro et al., 2014).

Se ha descrito que el NFYC promueve la expresión de oncogenes en las células del cáncer gástrico y del cáncer de próstata (Zhang et al., 2014a; Gong et al., 2013).

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

TIMM17A aparece sobreexpresado en células de cáncer de mama 21T y la expresión de su ARNm en los tejidos de cáncer de mama apareció correlacionada con la progresión tumoral (Xu et al., 2010).

TMEM209 se expresa ampliamente en el cáncer de pulmón. (Fujitomo et al., 2012).

TNK2, también llamado tirosina-cinasa ACK1, aparece activado, amplificado o mutado en una amplia variedad de cánceres humanos. La cinasa desregulada es oncogénica y su activación aparece correlacionada con la progresión al estadio metastásico. Los inhibidores de la ACK1 han demostrado resultados alentadores en estudios preclínicos (Mahajan and Mahajan, 2013).

TRIM55 codifica una proteína RING con dedos de zinc que está vinculada con los microtúbulos, la miosina y la titina durante el montaje del sarcómero muscular y también está implicada en la señalización entre el sarcómero y el núcleo (Pizon et al., 2002).

La interferencia del ARN de la proteína Ufd1 puede sensibilizar a la estirpe de células de cáncer de colon resistentes a la hidroxicamptotecina SW1116/HCPT a esta última sustancia (Chen et al., 2011a; Chen et al., 2011c).

En el cáncer colorrectal el gen UGT1A1 aparece silenciado por metilación y, por tanto, se considera el objetivo de la investigación relativa a la farmacorresistencia al irinotecán (CPT-11) y a los mecanismos de control para revertir tal resistencia (Xie et al., 2014).

UGT1A10 se expresa en el tejido gástrico y biliar (Strassburg et al., 1997) y su sobreexpresión aumenta significativamente la citotoxicidad del agente antitumoral 5-dimetilaminopropilamino-8-hidroxitriazoloacridinona C-1305 (Pawlowska et al., 2013). Asimismo, UGT1A10 cataliza la glucuronidación de xenobióticos, mutágenos y metabolitos reactivos y por tanto actúa como antioxidante indirecto. Se han detectado elementos de respuesta frente a xenobióticos (XRE) y antioxidantes (ARE) en los promotores de UGT1A8, UGT1A9 y UGT1A10 (Kalthoff et al., 2010).

UGT1A8 se expresa fundamentalmente en el tubo digestivo (Gregory et al., 2003) y la expresión de su ARNm aparece regulada al alza tras el tratamiento con el agente quimiopreventivo sulforafano (SFN) (Wang et al., 2012).

El haplotipo de UGT1A7 está asociado con un aumento del riesgo de carcinoma hepatocelular en portadores de la hepatitis B (Kong et al., 2008).

UGT1A6 está sobreexpresado en células de cáncer de mama resistentes al metotrexato (De Almagro et al., 2011) e inducido por la β-naftoflavona, un posible agente quimiopreventivo (Hanioka et al., 2012).

UGT1A9 se expresa principalmente en el hígado y en los riñones (Gregory et al., 2003). Los polimorfismos germinales de UGT1A9 son predictores potenciales de la recurrencia del cáncer de próstata tras la prostatectomía (Laverdiere et al., 2014).

Los polimorfismos del promotor y de la región codificante del UGT1A4 generan variabilidad en la glucuronidación del anastrozol, un inhibidor de la aromatasa para las pacientes con cáncer de mama (Edavana et al., 2013).

UPF1 forma parte de la maquinaria de degradación del ARNm mediada por mutaciones sin sentido (NMD) y podría cumplir un cometido funcional en la progresión y la metástasis del cáncer de próstata (Yang et al., 2013). Además, el gen de vigilancia del ARN UPF1aparece con frecuencia mutado en el carcinoma adenoescamoso de páncreas (Liu et al., 2014).

UQCRB es una subunidad del complejo mitocondrial III. La inhibición del UQCRB en las células tumorales suprime la angiogenia tumoral inducida por la hipoxia (Jung et al., 2013). Dos polimorfismos mononucleotídicos en la región no traducida 3' del UQCRB son candidatos a marcadores pronósticos del cáncer colorrectal (Lascorz et al., 2012).

Las alteraciones en el número de copias de USO1 están correlacionadas con la expresión génica diferencial en el melanoma de propagación superficial con respecto al melanoma nodular (Rose et al., 2011).

Se han detectado reducciones significativas de la expresión de las proteínas USP10 y SIRT6 en tumores de cáncer de colon humanos (Lin et al., 2013).

UTP18 también altera la traducción para promover la resistencia al estrés y el crecimiento, y con frecuencia se halla presente y sobreexpresado en el cáncer (Yang et al., 2014b).

El polimorfismo rs2074511 de VARS ha aparecido vinculado con la supervivencia en pacientes con cáncer de mama de tipo triple negativo y, por tanto, podría considerarse un factor pronóstico de la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama inicial (Chae et al., 2011).

VMP1, una proteína asociada a la autofagia inducida por el estrés, también es estimulada por el oncogén KRAS (Lo Re et al., 2012). VMP1 se sobreexpresa en el cáncer de páncreas humano escasamente diferenciado como respuesta a los fármacos antineoplásicos (Gilabert et al., 2013). Se ha hallado una regulación a la baja significativa del VMP1 en los tejidos de CHC humano y aparece estrechamente correlacionado con la afectación multiganglionar, ausencia de formación capsular, invasión venosa y pronóstico malo del CHC (Guo et al., 2012).

WDR26 protege las células miocárdicas contra el estrés oxidativo (Feng et al., 2012).

ZC3H7A forma parte de la familia de proteínas con dedos de zinc CCCH conocidas por ser reguladoras de la activación de los macrófagos (Liang et al., 2008). En el caso del ZC3H7A se han hallado frecuencias alélicas elevadas de mutaciones funcionales en el tumor metastásico del adenocarcinoma ductal de páncreas (Zhou et al., 2012).

FASN es una sintasa de ácidos grasos que interviene en la síntesis de lípidos potenciada que se da en diferentes tipos de cáncer, como de mama, páncreas, próstata, hígado, ovario, colon y endometrio (Wu et al., 2014; Zhao et al., 2013).

MO5 es una monooxigenasa que es la FMO hepática dominante, y está regulada al alza en los tumores de mama positivos para el receptor de estrógenos alfa (Bieche et al., 2004; Zhang and Cashman, 2006).

El ARNm de HADHA se reduce a medida que progresa la desdiferenciación en el CHC (Tanaka et al., 2013) y en los tumores de mama negativos para el receptor de estrógenos alfa (Mamtani and Kulkarni, 2012).

La variación genética del gen HAL podría estar implicada en el desarrollo del cáncer de piel (Welsh et al., 2008).

HLTF pertenece a la familia SWI/SNF de reguladores transcripcionales con actividad helicasa y ubiquitina-ligasa E3, y ha sido hallado inactivado por hipermetilación en tumores de colon, estómago, útero, vejiga y pulmón (Debauve et al., 2008; Castro et al., 2010; Garcia-Baquero et al., 2014).

HDAC10 es una histona-desacetilasa y un regulador transcripcional. La expresión de HDAC10 apareció notablemente reducida en tejidos de cáncer gástrico en comparación con los tejidos adyacentes (Jin et al., 2014). HDAC10 aparece inversamente relacionado con la metástasis ganglionar en las pacientes con carcinoma epidermoide de cuello uterino (Song et al., 2013). HDAC10 está hipermetilado en tumores malignos de la corteza suprarrenal (Fonseca et al., 2012). Los niveles de HDAC10 están elevados en la leucemia linfocítica crónica (Wang et al., 2011). El polimorfismo del promotor HDAC10-589C>T apareció asociado de manera significativa con la aparición del CHC en pacientes con hepatitis B crónica, así como con la aceleración del CHC en pacientes de ese tipo (Park et al., 2007). La reducción de la expresión de los genes de la histona-desacetilasa

de clase II está asociada con un pronóstico negativo en los pacientes con cáncer de pulmón (Osada et al., 2004).

HM13 es una peptidasa de péptido señal que influye en la viabilidad celular en el adenoma colorrectal (Sillars-Hardebol et al., 2012).

Las concentraciones en suero de HPR en los pacientes con linfoma maligno fueron notablemente superiores a las de los grupos de control sanos, y la expresión de la HPR aumentó en paralelo con la progresión de la enfermedad (Epelbaum et al., 1998). La expresión de HPR corre paralela al potencial maligno en el cáncer de mama, y es más probable que los tumores de este tipo que son positivos para la HPR experimenten recidivas tras la resección primaria, además de estar asociados con intervalos sin enfermedad más breves (Shurbaji et al., 1991).

Una variante (rs932335) del gen HSD11B1 está asociada con el cáncer colorrectal y el de mama (Feigelson et al., 2008; Wang et al., 2013b).

La expresión de HSD17B6 en tejidos de pacientes con cáncer de próstata sometidos a tratamiento supresor de andrógenos (ADT) fue significativamente superior que en los tejidos de individuos no tratados (Ishizaki et al., 2013).

HSPE1 es una chaperona mitocondrial con funciones en el plegamiento de proteínas y señalización celular (vías de NF-kappaB y WNT). El incremento de los niveles de Hsp10 se ha detectado en células tumorales de cáncer de intestino grueso, cáncer exocervical, cáncer de próstata, linfoma de células del manto y cáncer de ovario seroso. En la carcinogenia bronquial, se ha descrito la disminución de los niveles de Hsp10 (David et al., 2013).

Los xenoinjertos de carcinoma ovárico trasplantados en los costados de ratones atímicos y tratados con paclitaxel mostraron una expresión reducida de IDI1 en comparación con los xenoinjertos no tratados (Bani et al., 2004).

IGFBPL1 es un regulador de los factores de crecimiento insulinoides que aparece regulado a la baja en estirpes de células de cáncer de mama por efecto de una hipermetilación aberrante. La metilación de IGFBPL1 ha aparecido claramente asociada con peor supervivencia global y peor supervivencia sin enfermedad (Smith et al., 2007).

La proteína asociada a microsomas y sensible a andrógenos IKBKAP moduló la expresión de marcadores neuronales y del epitelio prostático, atenuó la proliferación a través de un mecanismo dependiente del receptor de andrógenos, y correguló la transcripción mediada por dicho receptor en células de adenocarcinoma de próstata LNCaP (Martinez et al., 2011).

INTS8 forma parte de un panel de marcadores que permite diferenciar a los carcinomas gástricos de los tejidos adyacentes no cancerosos (Cheng et al., 2013).

El péptido derivado de la IRS2 pIRS-21097-1105 apareció presente en melanomas HLA-A2(+) y en carcinomas de mama, ovario y colorrectales (Zarling et al., 2014). El genotipo IRS-2 1057 DD y el alelo D han aparecido asociados significativamente con el riesgo de CHC (Rashad et al., 2014).

ITGA7 es la cadena alfa de la integrina dimérica alfa-7/beta-1 del receptor de la laminina 1. ITGA7 es un gen oncosupresor crítico para la supresión del crecimiento de los tumores malignos. El análisis funcional ha revelado mutaciones de*ITGA7* en el cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, leiomiosarcoma de partes blandas y glioblastoma multiforme. ITGA7 apareció regulado a la baja en el cáncer de próstata no metastásico y en el leiomiosarcoma (Tan et al., 2013).

ITIH4 apareció regulado a la baja en diversos tejidos tumorales como los de colon, estómago, ovario, pulmón, riñón, recto y próstata (Hamm et al., 2008). Los bajos niveles séricos de ITIH4 están asociados con una supervivencia menor en los pacientes con CHC vinculado al HBV (Noh et al., 2014). En el cáncer de mama se han observado

concentraciones séricas notablemente elevadas de ITIH4, niveles que descendieron sustancialmente tras la extirpación quirúrgica (Van, I et al., 2010).

En el SHKBP1 se ha descubierto una mutación sin sentido que actúa en pasos ulteriores a FLT3, una tirosina-cinasa de receptor que aparece mutada en cerca del 30% de los casos de LMA (Greif et al., 2011).
SHKBP1 es uno de los diversos candidatos a biomarcador proteico para la clasificación de los tumores neuroendocrinos del intestino delgado diferenciados (WD-SI-NET, por sus siglas en inglés) en diferentes estadios de la enfermedad (Darmanis et al., 2013).

KIAA1161 es una proteína transmembrana de la membrana nuclear que guarda homología con la glucosidasa y que está implicada en la diferenciación de los mioblastos (Datta et al., 2009).

La expresión de KLB está elevada en los tejidos afectados por el CHC con respecto al tejido no tumoral similar (Poh et al., 2012).

El polimorfismo de LBP rs2232596 está asociado con un riesgo significativamente mayor de carcinoma colorrectal en los chinos de la etnia Han (Chen et al., 2011b). LBP es un candidato a biomarcador sérico en el carcinoma ovárico (Boylan et al., 2010). LBP apareció reducido significativamente tras el tratamiento con quimioterapia en pacientes con carcinoma de pulmón microcítico (Staal-van den Brekel AJ et al., 1997).

La expresión del ARNm de LBR apareció asociada directamente con el grado del tumor y con el Índice pronóstico de Nottingham para el cáncer de mama (Wazir et al., 2013). LBR se expresa intensamente en las células de carcinoma papilar de tiroides, pero el plegamiento anormal de la proteína podría explicar su carencia de reactividad inmunohistoquímica y estar relacionado con el plegamiento anómalo de la membrana nuclear (Recupero et al., 2010).

Se ha descrito la desregulación de LEPR en diversas células malignas tales como las de cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de mama y cáncer de pulmón (Ntikoudi et al., 2014; Surmacz, 2013; Uddin et al., 2011).

Algunos polimorfismos mononucleotídicos de LIG1 están relacionados con el riesgo de cáncer de pulmón, cáncer de endometrio y glioma (Doherty et al., 2011; Lee et al., 2008; Liu et al., 2009b).

La expresión de LRPPRC en tejidos de cáncer gástrico es significativamente superior a la del tejido control similar (Li et al., 2014b). Los niveles de LRPPRC sirven como marcador pronóstico en los pacientes con adenocarcinomas prostáticos (PCA), pues aquellos con niveles altos sobreviven menos tiempo tras la operación quirúrgica que los que presentan niveles bajos (Jiang et al., 2014). LRPPRC se expresa abundantemente en varios tipos de tumores, como el adenocarcinoma de pulmón, el carcinoma epidermoide de esófago, los adenocarcinomas de estómago, colon, mama y endometrio, así como en el linfoma (Tian et al., 2012).

La expresión de MANEA está regulada por los andrógenos en las células del cáncer de próstata (Romanuik et al., 2009).

OPLAH se expresa en los tejidos normales y tumorales de pulmón, mama, riñón, colon y ovario, y en algunos pacientes sus niveles son notablemente superiores en las muestras normales con respecto a los tumores (Srivenugopal and Ali-Osman, 1997).

Las glucoformas de ORM2 aportan información valiosa para distinguir entre el cáncer hepático primario y secundario (Mackiewicz and Mackiewicz, 1995). Se ha confirmado que los niveles plasmáticos de ORM2 están significativamente elevados en pacientes aquejados por carcinoma colorrectal comparados con los controles (Zhang et al., 2012). Los niveles de la glucoforma fucosilada de ORM2 resultaron significativamente mayores en casos de adenocarcinoma de pulmón con respecto a los controles (Ahn et al., 2014).

ORM2 es un presunto marcador para el diagnóstico precoz del colangiocarcinoma (Rucksaken et al., 2012).

Los niveles elevados de tetrahidrobiopterina provocan un incremento de la actividad de la PAH y de la proteína PAH en células de hepatoma humano (McGuire, 1991).

PARP14 se expresa intensamente en células plasmáticas del mieloma y está vinculado con la progresión de la enfermedad y una supervivencia poco halagüeña. PARP14 está implicada críticamente en la supervivencia dependiente de la JNK2. PARP14 parece promover la supervivencia de las células de mieloma al unirse e inhibir a la JNK1 (Barbarulo et al., 2013).

Los niveles de PC aparecen elevados en los tumores hepáticos y en el cáncer de pulmón (Chang and Morris, 1973; Fan et al., 2009).

Se han descrito niveles elevados de PCNT y de anomalías centrosómicas en diversas neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos, entre ellas la LMA, la LMC, linfoma de células del manto, cáncer de mama y cáncer de próstata (Delaval and Doxsey, 2010).

PIGN es un gen supresor de la inestabilidad cromosómica ligada al cáncer (CIN) que experimenta con frecuencia una pérdida del número de copias en el cáncer colorrectal CIN(+) (Burrell et al., 2013).

La expresión de PIPOX varía según el subtipo de cáncer de mama, pues los tumores de tipo HER-2 presentan una expresión elevada en tanto que el cáncer de mama triple negativo la presente reducida. La negatividad del tumor para PIPOX ha aparecido asociada a una supervivencia sin progresión de la enfermedad más breve(Yoon et al., 2014). PIPOX ha aparecido reducida en tumores de próstata y redujo el potencial oncogénico de las células prostáticas al metabolizar la sarcosina (Khan et al., 2013).

Se han detectado niveles elevados de PSMD4 en el cáncer de colon, el mieloma y el carcinoma hepatocelular (Arlt et al., 2009; Midorikawa et al., 2002; Shaughnessy, Jr. et al., 2011).

PLIN2 aparece notablemente elevado en los pacientes con carcinoma de células renales claras y renal papilar con respecto a los controles. Las concentraciones preoperatorias de PLIN2 en la orina reflejan el tamaño y el estadio del tumor (Morrissey et al., 2014). La expresión de PLIN2 es significativamente más alta en especímenes de adenocarcinoma de pulmón que en los tejidos normales y en los carcinomas epidermoides de pulmón (Zhang et al., 2014b).

PLK4 sufre con frecuencia una reorganización o pérdida en el cáncer humano, con un porcentaje especialmente alto en los carcinomas hepatocelulares, pero también en el cáncer colorrectal y en el cáncer de cabeza y cuello (Swallow et al., 2005). PLK4 aparece sobreexpresado en el cáncer de mama (Marina and Saavedra, 2014).

QARS pertenece a las aminoacil-ARNt-sintetasas (ARS) e incorpora glutamina a los ARNt. La expresión y los polimorfismos de la ARS están relacionados con el cáncer de mama y el glioblastoma (He et al., 2014b; Kim et al., 2012).

El gen PMF1 metilado es un biomarcador diagnóstico y pronóstico en los pacientes con cáncer vesical (Kandimalla et al., 2013).

PON2 aparece regulada al alza en varios tumores humanos y neoplasias malignas hematológicas, incluida la glándula tiroides, próstata, páncreas, testículos, endometrio/útero, cáncer de hígado y riñón, tejidos linfoides, tumores de vejiga urinaria, LLA y LMC, y dicha sobreexpresión confirió resistencia contra diferentes antineoplásicos (imatinib, doxorrubicina, estaurosporina y actinomicina) (Witte et al., 2011).

PRKAR2A es una subunidad reguladora de la proteína-cinasa A. PRKAR2A aumenta de manera muy acusada la supervivencia de estirpes celulares de cáncer de próstata

tratadas con taxol y docetaxel (Taxotere) (Zynda et al., 2014). PRKAR2A aparece sobreexpresada en el adenocarcinoma de pulmón (Bidkhori et al., 2013).

PRPF6 pertenece al complejo del spliceosoma tri-snRNP (ribonucleoproteína pequeña) que dirige la proliferación del cáncer de colon mediante el corte y empalme preferencial de los genes vinculados a la regulación del crecimiento (Adler et al., 2014). PRPF6 aparece sobreexpresada en el adenocarcinoma de pulmón (Bidkhori et al., 2013).

PSMC4 aparece regulada al alza de manera sustancial y uniforme en células de carcinoma de próstata en comparación con el tejido prostático normal adyacente (Hellwinkel et al., 2011).

La expresión de QPRT aumenta con la malignidad del glioma y, en los glioblastomas recidivantes tras la quimiorradioterapia, su expresión está relacionada con un pronóstico malo (Sahm et al., 2013). QPRT es un posible marcador para el cribado inmunohistoquímico de los nódulos foliculares de la tiroides (Hinsch et al., 2009).

RABGGTB está sobreexpresada en el linfoma de linfocitos B grandes difuso y refractario a la quimioterapia (Linderoth et al., 2008).

RAD21 está sobreexpresada en los tumores gastrointestinales, el carcinoma colorrectal, el cáncer de endometrio avanzado, el cáncer de próstata y el cáncer de mama (Atienza et al., 2005; Deb et al., 2014; Porkka et al., 2004; Supernat et al., 2012; Xu et al., 2014).

RAD23B podría intervenir en la progresión del cáncer de mama (Linge et al., 2014). El polimorfismo mononucleotídico rs1805329 de RAD23B ha aparecido significativamente asociado con el desarrollo y la recurrencia del CHC en pacientes japoneses portadores del HCV (Tomoda et al., 2012).

RASAL2 es una proteína activadora de la GTPasa Ras con funciones oncosupresoras en el cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos, el cáncer de ovario y el

cáncer de pulmón (Li and Li, 2014; Huang et al., 2014). En cambio, RASAL2 actúa como oncógeno en el cáncer de mama triple negativo e impulsa la invasión del mesénquima y la metástasis (Feng et al., 2014a).

La eliminación de RNMT inhibe de forma efectiva y específica el crecimiento de las células cancerosas y su capacidad invasiva en diferentes tipos de cáncer, entre ellos el hepático (Stefanska et al., 2014).

Se ha descrito la sobreexpresión de ROCK1 o mutaciones en dicho gen que propician un aumento de la actividad cinasa en varios tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón, carcinoma gástrico, LMC y LMA (Rath and Olson, 2012).

RPL10A es un gen diana para c-Myc y podría contribuir a la transformación de los hepatocitos (Hunecke et al., 2012).

Los puntos de ruptura Inv(3) y t(3;3), relacionados con un pronóstico especialmente negativo en la leucemia mieloide o la mielodisplasia, se concentran en una región centromérica situada por detrás del gen RPN1 (Wieser, 2002).

RRBP1 aparece sobreexpresado en el cáncer de pulmón y de mama (Telikicherla et al., 2012; Tsai et al., 2013).

La expresión de SCFD1 aparece elevada en la gastritis erosiva, que está vinculada con el carcinoma gástrico (Galamb et al., 2008).

ABCB1 codifica la glucoproteína P (P-gp), que se expresa en las células normales de diversos órganos como son el intestino, hígado, riñón, cerebro y la placenta. Se ha detectado la sobreexpresión y varios polimorfismos genéticos de la P-gp en el carcinoma colorrectal, en tumores de las glándulas suprarrenales, en el cáncer de pulmón y en la LLA (Zhang et al., 2013a; Fojo et al., 1987; Gervasini et al., 2006; Jamroziak et al., 2004).

ABCB10 codifica un transportador ABC de la subfamilia B (MDR/TAP). Se ha demostrado que ABCB10 está implicado en la resistencia al cisplatino en las células de carcinoma epidermoide humano KCP-4 (Oiso et al., 2014).

Se ha demostrado que la expresión de ABCB11 está regulada al alza en el adenocarcinoma ductal de páncreas, uno de los tipos de cáncer más farmacorresistentes, por lo que podría contribuir a la respuesta generalmente mala del mismo a los tratamientos (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013).

La expresión al alza de ABCC2 en los carcinomas primarios de trompa de Falopio está asociada con un pronóstico malo (Halon et al., 2013).

ABCC6 apareció regulado a la baja en el cáncer colorrectal de pacientes que no respondían a la quimioterapia paliativa (Hlavata et al., 2012). En cambio, apareció regulado al alza en células humanas A549 de carcinoma de pulmón amicrocítico resistentes a la gemcitabina (Ikeda et al., 2011).

La expresión de ACACA está regulada al alza en numerosos tipos de cáncer humanos, entre ellos el carcinoma de mama, próstata e hígado y aparece correlacionada con la potenciación de la lipogenia de las células cancerosas. Los diferentes inhibidores de ACACA han manifestado un efecto terapéutico en el tratamiento de estirpes de células tumorales a través de la supresión de la proliferación y de la inducción de la muerte celular por apoptosis (Zu et al., 2013).

ACLY se expresa aberrantemente en varios tumores, como los de mama, hígado, colon, pulmón y próstata, y está correlacionada a la inversa con el estadio y la diferenciación del tumor (Zu et al., 2012).

ACSL3 aparece sobreexpresada en el cáncer de pulmón y, a tenor de estudios preclínicos, es una prometedora diana terapéutica para dicho cáncer (Pei et al., 2013).

La expresión regulada al alza de ACSL3 podría servir como biomarcador del riesgo del cáncer de mama específico del receptor de estrógenos (Wang et al., 2013c).

ACSL4 aparece sobreexpresada en los tumores de mama negativos para el receptor de estrógenos y en los tumores de próstata y de mama negativos para el receptor de andrógenos. La pérdida de sensibilidad a las hormonas esteroideas ha aparecido asociada con la inducción de la expresión de ACSL4 (Monaco et al., 2010). Se ha comprobado que la regulación al alza de ACSL4 comienza durante la transformación del adenoma en adenocarcinoma (Cao et al., 2001).

La metilación de ACSS3 parece estar relacionada con al menos uno de los factores de riesgo clásicos del neuroblastoma, esto es, edad, estadio o el estado del gen MYCN (Decock et al., 2012).

La deleción de ADSSL1 se ha observado con frecuencia en adenocarcinomas primarios de pulmón de ratón inducidos por carcinógenos, en estirpes de células de adenocarcinoma de ratón y humanas, y está asociada con un fenotipo de inestabilidad cromosómica más amplia en tumores primarios de pulmón de ratón (Miller et al., 2009).

AGFG2 ha sido identificada como uno de los 14 candidatos a gen pronóstico para detectar los casos de cáncer de mama triple negativos o negativos para hormonorreceptores que probablemente no sufrirán recidivas metastásicas (Yau et al., 2010).

AGT es un factor antiangiogénico sumamente potente que ha demostrado ejercer efectos antitumorales en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Bouquet et al., 2006). En ratones transgénicos, la sobreexpresión del AGT humano ha demostrado reducir la angiogenia y disminuir así la progresión tumoral en el hepatocarcinoma (Vincent et al., 2009).

AKR1C4 codifica el miembro C4 de la familia de la aldo-cetorreductasa 1 humana que cataliza la reducción del retinaldehído en retinol (Ruiz et al., 2011). Por consiguiente, la

eliminación del retinaldehído regula a la baja la biosíntesis del ácido retinoico que se ve seguida por el bloqueo de la vía de señalización de los retinoides, lo cual favorece la progresión tumoral (Tang and Gudas, 2011; Ruiz et al., 2012).

La expresión de ALDH1L1 ha demostrado estar regulada a la baja en el CHC y en los gliomas. La regulación a la baja de ALDH1L1 en tales tipos de cáncer se ha relacionado con un pronóstico más negativo y un fenotipo más agresivo (Rodriguez et al., 2008; Chen et al., 2012b).

La expresión de ALG3 ha demostrado estar potenciada en el carcinoma epidermoide de esófago y en el cáncer del cuello uterino (Shi et al., 2014; Choi et al., 2007). En el carcinoma epidermoide de esófago el aumento de la expresión de ALG3 apareció correlacionado con la metástasis ganglionar (Shi et al., 2014).

ANKS1A ha sido identificada como una nueva diana de la familia de cinasas Src que son conocidas por estar implicadas en el desarrollo de algunos cánceres colorrectales (Emaduddin et al., 2008).

APOA1 codifica la apolipoproteína A-1, el principal componente proteico de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) del plasma. En múltiples modelos animales de tumor, la APOA1 ha evidenciado una potente acción inmunomoduladora en la oncogenia y ha demostrado suprimir el crecimiento y la metástasis tumorales al sustentar procesos del sistema inmunitario innato y adaptativo (Zamanian-Daryoush et al., 2013).

Se ha demostrado que la APOA2 se reduce notablemente en los pacientes con cáncer de páncreas (Honda et al., 2012). Por el contrario, el aumento de su expresión se ha vinculado con el CHC (Liu et al., 2007).

En el CHC vinculado con el HBV y negativo para la alfa-fetoproteína, la APOB ha resultado ser una de las 14 proteínas expresadas diferencialmente que podrían estar asociadas con la progresión de dicho cáncer (He et al., 2014a). En el cáncer de mama

avanzado, APOB ha resultado ser una de las seis proteínas con expresión diferencial que podrían predecir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y la supervivencia sin recidiva de las pacientes (Hyung et al., 2011).

En los pacientes con cáncer colorrectal en estadio III y en las células de melanoma humanas, la AQP9 apareció asociada con mayor quimiorresistencia (Dou et al., 2013; Gao et al., 2012).

ARG1 ha demostrado ser un marcador sensible y específico para distinguir el CHC de otros tumores metastásicos del hígado (Sang et al., 2013). ARG1 podría contribuir a la supresión de la inmunidad local en el carcinoma de pulmón amicrocítico (Rotondo et al., 2009).

La forma fosforilada, y por tanto más activa, de la proteína ARSB ha resultado estar elevada en los leucocitos periféricos de pacientes con leucemia mielógena crónica con respecto a los de los donantes sanos (Uehara et al., 1983).

En las células de cáncer de ovario se ha demostrado que la regulación a la baja de ASNA1 aumenta la sensibilidad a los antineoplásicos siguientes: cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y arsenito (Hemmingsson et al., 2009).

Se ha demostrado que ASPH está sobreexpresada en varios tipos de cáncer y de estirpes de células cancerosas (Yang et al., 2010). La inmunización con células dendríticas cargadas con ASPH generó citotoxicidad contra células de colangiocarcinoma en condiciones *in vitro* y suprimió sustancialmente el crecimiento tumoral intrahepático y la metástasis (Noda et al., 2012).

ATP1A2 es una de las 31 proteínas halladas como reguladas significativamente al alza en el glioblastoma (Com et al., 2012). En cambio, ATP1A2 ha aparecido regulada a la baja en neuroblastomas metastásicos infiltrados en la médula ósea (Morandi et al., 2012).

ATP1A3 es una de las 31 proteínas halladas como reguladas significativamente al alza en el glioblastoma (Com et al., 2012).

ATP6V1C1 podría promover el crecimiento del cáncer de mama y de las metástasis óseas a través de la regulación de la actividad de la V-ATPasa lisosómica. La reducción de la expresión del ATP6V1C1 inhibió sustancialmente el crecimiento, la metástasis y las lesiones osteolíticas derivadas de xenoinjertos de células tumorales de mama de ratón 4T1 en condiciones *in vivo* (Feng et al., 2013). ATP6V1C1 ha demostrado estar sobreexpresado en el carcinoma epidermoide oral y asociado con la movilidad de las células tumorales (Otero-Rey et al., 2008).

ATP7B está vinculada con la resistencia del cáncer al cisplatino, un antineoplásico de amplio uso (Dmitriev, 2011).

AXIN2 codifica la proteína 2 relacionada con la axina (inhibición del eje), que presumiblemente juega un papel importante en la regulación de la estabilidad de la beta-catenina en la vía de señalización de Wnt (Salahshor and Woodgett, 2005). Asimismo, AXIN2 ha demostrado reprimir la expresión del oncogén c-MYC (Rennoll et al., 2014).

En el CHC, la baja expresión de BAAT ha aparecido asociada con una supervivencia peor respecto a los pacientes en los que la expresión era más elevada (Furutani et al., 1996).

Se ha demostrado el fuerte descenso de los transcritos de BHMT y BHMT2 en células HepG2 y en muestras de CHC con respecto al tejido hepático normal (Pellanda et al., 2012).

C12orf44 ha demostrado ser esencial para la autofagia e interacciona con ULK1 de modo dependiente de Atg13 (Mercer et al., 2009). La autofagia desempeña dos cometidos opuestos en el cáncer, actuando al mismo tiempo como oncosupresor al evitar la

acumulación de proteínas y de orgánulos dañados, y como mecanismo de supervivencia celular que puede promover el crecimiento de los tumores consolidados (Yang et al., 2011b).

C17orf70 es un componente del complejo central de la anemia de Fanconi y resulta esencial para la estabilidad de dicho complejo. El complejo central de la anemia de Fanconi desempeña un papel crucial en la red de respuesta a los daños sufridos por el ADN. La respuesta al daño del ADN mediada por dicho complejo implica a los productos génicos de sensibilidad del cáncer de mama BRCA1 y BRCA2 (Ling et al., 2007).

Se ha demostrado que C19orf80 codifica el genTD26 asociado al carcinoma hepatocelular, que ha demostrado ser uno de los cinco *locus* con mayores niveles de metilación en el CHC y menores en el tejido de control (Ammerpohl et al., 2012).

Se ha descubierto que CCT7 forma parte de una red secundaria de proteínas que es notablemente diferenciadora del cáncer colorrectal humano avanzado (Nibbe et al., 2009).

Se ha comprobado que la CDK6 regula la actividad de la proteína oncosupresora Rb. CDK6 puede ejercer su función oncopromotora al potenciar la proliferación y estimular la angiogenia (Kollmann et al., 2013). Se ha observado que la inhibición farmacológica de CDK6 inhibe la diferenciación durante el crecimiento de las células leucémicas anormales (Placke et al., 2014).

CFH podría intervenir en la progresión del carcinoma espinocelular de la piel (Riihila et al., 2014). CFH podría desempeñar un papel clave en la resistencia a la lisis mediada por el complemento en varias células cancerosas y se ha demostrado su sobreexpresión en el carcinoma de pulmón amicrocítico, que aparece relacionada con un pronóstico más negativo (Cui et al., 2011).

Del gen CLPTM1 se ha hallado una mutación inactivadora en el cáncer de próstata (Rossi et al., 2005).

CMAS codifica la citidina monofosfato-ácido N-acetilneuramínico-sintetasa, que cataliza la activación del ácido siálico y de su transformación en un diéster de monofosfato de citidina. El ácido siálico activado es destinado a la N-glucosilación, una modificación postraduccional habitual durante la diferenciación celular. El aumento de la expresión de los glúcidos con ácido siálico en la superficie de las células cancerosas es una de las características tumorales mejor conocidas (Bull et al., 2014).

La transferrina (TF) es uno de los ligandos tumorales más utilizados, porque los receptores de TF (TFR) están sobreexpresados en las células malignas y desempeñan un papel clave en la captación del hierro celular a través de su interacción con la transferrina (Biswas et al., 2013). Se ha sugerido que el nivel de expresión de los receptores TFR está correlacionado con el estadio tumoral o con la progresión del cáncer (Tortorella and Karagiannis, 2014).

TH1L podría tener un papel relevante en la regulación de la proliferación y de la invasión en el cáncer de mama humano y podría servir como diana terapéutica contra ese cáncer (Zou et al., 2010).

La hidrólisis mediada por la THTPA podría ser la responsable de los efectos antiproliferativos del Ndrg-1. La Ndrg-1 ha demostrado reducir la capacidad invasiva y la metástasis en el cáncer de mama, colon, próstata y páncreas (Kovacevic et al., 2008).

SMYD3 promueve la invasión tumoral por la regulación al alza a través de mecanismos epigenéticos de la metaloproteinasa MMP-9 (Medjkane et al., 2012). La expresión del SMYD3 es indetectable o ínfima en muchos tipos de tejido humano normal, en tanto que su sobreexpresión ha sido vinculada con el desarrollo y la progresión del cáncer gástrico, colorrectal, hepatocelular, de próstata y de mama (Hamamoto et al., 2006; Liu et al., 2014; Liu et al., 2013a).

Se ha observado un vínculo entre STAT2 y la oncogenia en ratones transgénicos carentes de STAT2 (Yue et al., 2015) o cuyo cerebro expresaba constitutivamente el IFN-α (Wang et al., 2003).

TACC3 aparece sobreexpresada en muchos tipos de cáncer humanos, como el cáncer de ovario, cáncer de mama, carcinoma epidermoide y linfoma (Ma et al., 2003; Jacquemier et al., 2005; Lauffart et al., 2005).

SPBP también reprime la actividad transcripcional del receptor de estrógenos α (ERα). La sobreexpresión del SPBP inhibió la proliferación de una estirpe celular de cáncer de mama dependiente del ERα (Gburcik et al., 2005). En el núcleo celular, la SPBP muestra una movilidad relativamente baja y aparece concentrada en las regiones de cromatina densa, lo cual indica con claridad que es una proteína afín a la cromatina (Darvekar et al., 2012). TCF20 es importante para la potenciación de la inducción de las proteínas implicadas en el programa defensivo celular contra el estrés oxidativo (Darvekar et al., 2014).

C3 es un elemento destacado del microentorno inflamatorio del tumor (Rutkowski et al., 2010) cuya activación podría ser positiva para el crecimiento del tumor (Markiewski et al., 2008). La hidrólisis enzimática de C3 conduce a la producción de la anafilotoxina C3a, un mediador inflamatorio y quimiotáctico, así como de C3b (Sahu et al., 1998).

CLN3 es un gen antiapoptósico en células precursoras neuronales NT2 y en unos pocos tipos de cáncer (Zhu et al., 2014b). Interviene en el tráfico y en la regulación intracelular en células neuronales y no neuronales (Rakheja et al., 2008; Getty and Pearce, 2011) y está implicado en varias vías de señalización importantes(Persaud-Sawin et al., 2002). El ARNm y la proteína del CLN3 están sobreexpresados en diversas estirpes de células tumorales, entre ellas de mama, colon, melanoma maligno, próstata, ovario, neuroblastoma y glioblastoma multiforme, pero no en cambio en estirpes de cáncer de pulmón y de páncreas (Rylova et al., 2002).

SLC13A5 es uno de los 7 genes marcadores del fenotipo metilador de las islas CpG (CIMP). El fenotipo CIMP de los carcinomas renales de células claras se caracteriza por la acumulación de la metilación del ADN en las islas de CpG y un pronóstico más negativo para el paciente (Tian et al., 2014; Arai et al., 2012).

Además, SLC35B2 interviene en la regulación transcripcional coordinada durante la inducción de la biosíntesis del sulfo-glucano de Lewis X (Le^x) sializado en la inflamación aguda (Huopaniemi et al., 2004) y en la sulfatación del epítopo 6-sulfolactosamina en una estirpe de células de carcinoma colorrectal humano(Kamiyama et al., 2006). Tanto estirpes celulares de carcinoma colorrectal como los tejidos colorrectales humanos expresan la SLC35B2 (Kamiyama et al., 2011).

La expresión de PLOD1 está asociada con la progresión del cáncer de mama humano (Gilkes et al., 2013).

PRDX5 aparece regulada al alza en numerosos tumores malignos (Urig and Becker, 2006) y su inhibición puede impedir la iniciación y la progresión del tumor, lo cual la señala como una diana prometedora en el tratamiento contra el cáncer. Su centro activo con selenocisteína, altamente nucleófilo y accesible, podría servir como diana de primer orden para el diseño de fármacos (Liu et al., 2012).

El aumento de la expresión de PSMD8 en el pulmón periférico podría aportar información sobre las principales poblaciones celulares implicadas en el desarrollo de tumores malignos invasivos (Zhou et al., 1996).

SNRPD1 es una proteína importante del spliceosoma, que está regulada al alza en tumores malignosLa reducción de la expresión del SPTBN1 está relacionada con el empeoramiento del pronóstico del cáncer de páncreas (Jiang et al., 2010).

SQSTM1 actúa como nodo de señalización de varias vías de transducción de la señal, como las del NF-κB, la apoptosis y la activación del Nrf2, cuya desregulación está vinculada con la osteopatía de Paget y la oncogenia (Komatsu et al., 2012).

La expresión de PCNA predice la supervivencia en el melanoma anorrectal maligno (Ben-Izhak et al., 2002). Se conoce una isoforma de PCNA asociada con el cáncer (caPCNA) que contiene un patrón inusual de grupos metiléster en numerosos residuos de ácido glutámico y aspártico (Hoelz et al., 2006).

La eliminación del SRP54 en varias estirpes de células tumorales no generó fenotipos celulares manifiestos, como la parálisis del crecimiento o la muerte, ni siquiera en células escogidas por la reducción estable de componentes del SRP (Ren et al., 2004).

A nivel molecular, STAT1 inhibe la proliferación de células tumorales humanas y de ratón tratadas con IFN-γ a través de su capacidad para aumentar la expresión del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21Cip1, o de reducir la expresión de c-myc (Ramana et al., 2000). La actividad antitumoral de STAT1 se ve reforzada por su capacidad para inhibir la angiogenia y la metástasis tumoral en modelos de ratón (Huang et al., 2002). Se ha demostrado que el aumento de los niveles del ARNm de STAT1 forma parte de una firma molecular asociada con una predicción más favorable del resultado metastásico en las pacientes con cáncer de mama triple negativo y negativo para los receptores hormonales (Yau et al., 2010).

Muestras de neoplasias foliculares tomadas por aspiración con aguja fina demuestran que los nódulos malignos sobreexpresan la STT3A en comparación con la enfermedad benigna (Patel et al., 2011).

Un metanálisis ha evidenciado que el polimorfismo rs6504950 de STXBP4/COX11 aparece correlacionado significativamente con el riesgo de cáncer de mama (Tang et al., 2012).

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

La presente invención se refiere, además, a un péptido conforme a la presente invención, en que dicho péptido está modificado y/o incluye enlaces no peptídicos tal y como se describe más adelante.

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, a anticuerpos tal y como se describen más adelante, y a los métodos para fabricarlos. Se prefieren anticuerpos que sean específicos para los péptidos de la presente invención, y/o para los péptidos de la presente invención cuando están unidos a su MHC. Los anticuerpos preferidos pueden ser monoclonales.

La presente invención se refiere, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en particular TCR solubles (TCRs), acordes con la presente invención y/o con los complejos péptido-MHC de la misma, y métodos para sintetizarlos.

La presente invención se refiere, además, a anticuerpos o a otras moléculas de unión que reconozcan los péptidos acordes con la invención y/o con los complejos péptido-MHC de la misma, y métodos para sintetizarlos.

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

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

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

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

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

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

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con la SEQ ID N.º 255, conforme con la presente invención con la molécula MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de

Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

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

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

Cada soporte se puede conjugar con una segunda molécula activa, como por ejemplo IL-21, anti-CD3 o anti-CD28. Los soportes polipeptídicos aparecen descritos, por ejemplo, en el apartado de antecedentes de WO2014/071978A1, y en las referencias citadas en ella.

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

La presente invención se refiere, además, a un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, el cual comprende la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de los linfocitos T con moléculas MHC de clase I o II humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno al menos un péptido conforme a la presente invención. La presente invención se refiere, además, a un método en que dicho antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 255, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa 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 invención,

comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T conforme a la presente invención.

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

La presente invención concierne, además, al uso conforme a la presente invención, en que dicho medicamento es una vacuna, una célula, una población de células, como por ejemplo, una estirpe celular, TCR solubles y anticuerpos monoclonales.

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 que dichas células cancerosas son células de carcinoma hepatocelular (CHC).

La presente invención se refiere, además, a proteínas marcadoras y a biomarcadores concretos basados en los péptidos conformes a la presente invención que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del CHC.

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

Además, la presente invención se refiere a un método para producir una vacuna personalizada contra el cáncer para un paciente en concreto mediante una base de datos (también designada en la presente memoria como «archivo») de péptidos asociados a tumores preseleccionados.

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

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y de destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12 o 13, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos de la invención) pueden tener hasta 14, 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 típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, como por ejemplo, sales de cloruro o

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

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

El término «los péptidos de la presente invención» incluirá los péptidos que consisten o comprenden un péptido tal y como se ha definido antes según las SEQ ID N.º 255.

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

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

Un «epítopo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos.

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

Tabla 6: Frecuencias de expresión F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y los serotipos más frecuentes del HLA-DR. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$ (Mori M, et al. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):1017-27). Las combinaciones de A*02 o A*24 con determinados alelos HLA-DR podrían ser más o menos abundantes de lo esperado a partir de sus frecuencias aisladas debido al desequilibrio de ligamiento. Para más detalles véase Chanock y cols. (S. J. Chanock, et al (2004) HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and DRB1 in an African American population from Bethesda, USA Human Immunology, 65: 1223-1235).

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*02	Caucásica (América del Norte)	49,1%
A*02	Afroamericana (América del Norte)	34,1%
A*02	Asioamericana (América del Norte)	43,2%
A*02	Latinoamericana (América del Norte)	48,3%
DR1	Caucásica (América del Norte)	19,4%

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
DR2	Caucásica (América del Norte)	28,2%
DR3	Caucásica (América del Norte)	20,6%
DR4	Caucásica (América del Norte)	30,7%
DR5	Caucásica (América del Norte)	23,3%
DR6	Caucásica (América del Norte)	26,7%
DR7	Caucásica (América del Norte)	24,8%
DR8	Caucásica (América del Norte)	5,7%
DR9	Caucásica (América del Norte)	2,1%
DR1	Afroamericana (América del Norte)	13,20%
DR2	Afroamericana (América del Norte)	29,80%
DR3	Afroamericana (América del Norte)	24,80%
DR4	Afroamericana (América del Norte)	11,10%
DR5	Afroamericana (América del Norte)	31,10%
DR6	Afroamericana (América del Norte)	33,70%
DR7	Afroamericana (América del Norte)	19,20%
DR8	Afroamericana (América del Norte)	12,10%
DR9	Afroamericana (América del Norte)	5,80%
DR1	Asioamericana (América del Norte)	6,80%
DR2	Asioamericana (América del Norte)	33,80%
DR3	Asioamericana (América del Norte)	9,20%
DR4	Asioamericana (América del Norte)	28,60%
DR5	Asioamericana (América del Norte)	30,00%
DR6	Asioamericana (América del Norte)	25,10%
DR7	Asioamericana (América del Norte)	13,40%
DR8	Asioamericana (América del Norte)	12,70%
DR9	Asioamericana (América del Norte)	18,60%
DR1	Latinoamericana (América del Norte)	15,30%
DR2	Latinoamericana (América del Norte)	21,20%
DR3	Latinoamericana (América del Norte)	15,20%
DR4	Latinoamericana (América del Norte)	36,80%
DR5	Latinoamericana (América del Norte)	20,00%
DR6	Latinoamericana (América del Norte)	31,10%
DR7	Latinoamericana (América del Norte)	20,20%
DR8	Latinoamericana (América del Norte)	18,60%
DR9	Latinoamericana (América del Norte)	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	América del Sur	20%
A*24	Europa	18%

Los péptidos de la invención, preferiblemente cuando figuren incluidos en una vacuna de la invención tal y como se describe en la presente memoria, se unirán a A*02 o a A*24. Una vacuna también podría incluir péptidos que se unan a cualquier MHC de clase II. Por consiguiente, la vacuna de la invención puede ser usada para tratar el cáncer en pacientes que sean A*02 positivos, A*24 positivos o bien positivos para A*02 y para A*24, mientras que la no selección para los alotipos de MHC de clase II es necesaria debido a la naturaleza panunionista de esos péptidos.

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

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ADN incluye tanto ADN monocatenario como 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 derivar de un gen no mutado («normal»), mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos conforme a la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del

0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada.

El término «fragmento activo» define un fragmento, normalmente un péptido, polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos, que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunogénica) cuando se administra −solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado o en un vector− a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

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

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

Identidad porcentual = 100 [1 -(C/R)]

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

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

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

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

(IV) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

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

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

Los péptidos originales (sin modificar) descritos aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Preferentemente tales sustituciones estarían situadas al final de la cadena de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, si un aminoácido es reemplazado por un aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrófobo que es sustituido por otro aminoácido hidrófobo. 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 y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).

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

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los presentes en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados como sustitutos para producir polipéptidos inmunógenos e inmunogénicos de acuerdo con la presente descripción.

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.

A continuación en la Tabla 7 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/extensión pueden ser los péptidos de la secuencia original de la proteína o cualquier otro aminoácido(s). 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 linfocitos T específicos para un péptido acorde con la presente invención se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, preferiblemente como máximo de alrededor de 1 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 linfocitos T 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 cuatro residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.

Las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas y presentan péptidos derivados de la escisión proteolítica principalmente de proteínas endógenas, citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía.

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

uno de los fines de la presente invención consiste en proveer composiciones de péptidos que contengan péptidos de unión a complejos MHC de cualquiera de las 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 carcinoma hepatocelular (CHC) en particular. Existe igualmente la necesidad de identificar factores que puedan ser utilizados para el tratamiento contra el cáncer en general y contra el CHC en particular.

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

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

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej. células de CHC 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 (véase el Ejemplo 3). 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 ácidos nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante). Cabe esperar que la respuesta inmunitaria generada por esa vacunación terapéutica sea muy específica contra las células tumorales porque los tejidos normales no contienen los péptidos diana de la presente invención en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

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

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo $–NH_2$ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales

ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej. ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

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

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

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

La detección de los péptidos en una muestra de tejido enfermo puede ayudar a decidir si los tratamientos que implican al sistema inmunitario pueden ser beneficiosos, sobre todo si se sabe o se prevé que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de

acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo conocido con el que las células infectadas o cancerosas logran eludir la vigilancia del sistema inmunitario. Así pues, la presencia de los péptidos indica que dicho mecanismo no es utilizado por las células analizadas.

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

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

Por tanto, existe otro aspecto de la invención que proporciona un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: inmunizar un mamífero no humano

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

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

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

conocer en WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en Cohen CJ, et al. 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, et al. 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, et al. 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 (TCRs) 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 una 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, et al. Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. Protein Eng 2003 Sep;16(9):707-711.; Card KF, 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, 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, por ejemplo, US 2013/0115191), dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en las células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia a un receptor. Se puede encontrar más información en WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. Se describe una combinación de TCRs en WO 2012/056407A1. Otros métodos de producción se revelan en WO 2013/057586A1.

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

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 consolidar después en una puntuación de sobrepresentación calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (J. Pinheiro, et al. The nlme Package: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. 2007) 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 sus secuencias se identificaron 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 CHC (N = 16

muestras A*02-positivas que incluyeron trece muestras A*02:01-positivas, N = 15 muestras A*24-positivas) con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación natural de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de 31 pacientes con CHC.

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 la identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

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

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

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos tumorales de CHC y normales se cuantificaron con el 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 a un péptido que comprende una secuencia de la SEQ ID N.º 255, o a una variante de la misma que es al menos un 90% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 255 o una variante de la misma que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, en que dicho péptido no es un polipéptido entero subyacente.

La presente invención se refiere además a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 255 o a una variante de la misma que es al menos un 90% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 255, en que dicho péptido o variante tiene una longitud total de 8 a 100, preferiblemente de 8 a 30, y más preferiblemente de 8 a 14 aminoácidos.

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

La presente invención se refiere además a los péptidos acordes con la presente invención en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 255.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere además al método acorde con la invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 255, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

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

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

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

La presente invención se refiere, además, a proteínas marcadoras y biomarcadores concretos basados en los péptidos conformes a la presente invención, aquí denominadas «dianas» que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del carcinoma

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

El término «anticuerpo» o «anticuerpos» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas o «enteras», el término «anticuerpos» también incluye los fragmentos (p. ej. fragmentos CDRs, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las mismas, siempre que exhiban alguna de las propiedades deseadas (p. ej. , unión específica de un polipéptido marcador del CHC, liberación de una toxina en una célula de CHC que exprese un gen marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del CHC) 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 generar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto los polipéptidos marcadores del CHC enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la invención se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural o se puede producir con técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un ADNc que codifique un péptido acorde con la presente invención, como un péptido acorde con la SEQ ID N.º 255, o una variante o fragmento del mismo, 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 la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador del CHC 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, inmunotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.

El término «anticuerpo monoclonal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población notablemente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posiblemente naturales que pueden estar presentes en pequeño número. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (N.º pat. de EE. UU. 4. 816. 567, que se incorpora a la presente memoria íntegramente).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que estimula a los linfocitos para que produzcan

o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Otra alternativa consiste en inmunizar los linfocitos *in vitro*.

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

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

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la 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 quiméricos 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 hidrófobos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, p. ej. películas, liposomas o micropartículas. Para las personas versadas en la técnica será evidente que son preferibles ciertos vehículos dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se va a administrar.

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

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

Puesto que los péptidos como los mencionados en las Tablas de las páginas anteriores de la invención y por tanto sus polipéptidos subyacentes se expresan notablemente en el CHC, y se expresan en niveles extremadamente bajos en las células normales, la inhibición de una proteína seleccionada entre el grupo consistente en productos proteicos de los genes siguientes: Preferentemente para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR contra GLUL, GPAM, PLIN2,SLC16A1,SLC9A3R1, PCBD1, SEC16A, AKR1C4, ABCB11, HAL, CYP2E1, C4A, C4B, ALDH1L1, CRP, ACSL4, EEF2, HLTF, FBXO22,

GALK1, TMCO1, TMEM33, ZNF318, IPO9, AMACR, C1QTNF3, CYP4F8, CYP4F3, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, MOCOS, A1CF, COL18A1, HPR, LBP, C19orf80, CFHR5, ITIH4, TMEM110, LARP4, LMF2, SLC10A5, y SLC16A11; más preferentemente aún para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR contra ANKFY1, C12orf44, C16orf58, CPSF1, DCAF8, PEX19, DDX11, DDX12P, DECR2, NME4, DENND5B,DYM, EDC4, ERI3, FAM20A, FNDC3A,GPR107, GYG2, HEATR2, IFT81, KCTD3,SHKBP1, KIAA1324L, KLHL24, MARCH6, MBTPS2, MIR1279, CPSF6, NOC4L, NXF1, PANK2, PCNXL3, PIPSL, PSMD4, PSMD14, SLC35B1, TCP11L2, THNSL2, THOC2, TOMM5, TRAPPC6B, TRIM54, TRIM55, TRIM63, UGGT2, URB1, VPS54, WIZ, ZNF451, RFTN2, SCFD1, SERINC5, CCT7P2, CMAS, ANKS1A, C17orf70, CCT7, CDK5RAP2, CLPTM1; y preferentemente sobre todo para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR contra APOB, FASN, y/o COPA; y la expresión o la actividad de esos marcadores puede ser integrada preferiblemente en una estrategia terapéutica, p. ej. para el tratamiento o la prevención del CHC.

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 la 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 tal forma que puedan 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/diana del CHC con terapia génica antisentido se puede lograr con la administración directa de ARN antisentido del marcador tumoral 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 continuación.

Otra estrategia alternativa para inhibir la función de una proteína seleccionada del grupo constituido por las susodichas proteínas, y preferentemente de APOB, FASN y/o COPA, consiste en el uso de un ácido nucleico (p. ej. ARNsi, o un ácido nucleico que codifique un anticuerpo antiproteína o una porción del mismo, que pueda ser transferido a células cancerosas u otras células que acaben expresando en su interior el anticuerpo y segregándolo), una proteína o una molécula pequeña, o cualquier otro compuesto que tenga como blanco la expresión, la traducción y/o la función biológica de esta proteína.

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 ser incorporados a un vector en forma de ADN desnudo o de ácidos nucleicos para suministrar los ácidos nucleicos a las células con los que inhibir la expresión de la proteína marcadora del CHC. 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, Maryland, EE. UU.), Superfect (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y Transfectam (Promega Biotec, Inc., Madison,

Wisconsin, 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, California, 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 puede ser usado para infectar y así inocular el ácido nucleico antisentido a las células infectadas que inhiba la expresión de una proteína seleccionada entre el grupo consistente en las proteínas antes mencionadas. 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 radionúclido (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, 3H, ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (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 espectroscopía; radioscopia, tomografía computadorizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas

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

Tal y como se ha dicho antes, la presente invención se refiere por tanto a un péptido que comprende una secuencia de la SEQ ID N.º 255 o una variante de la misma que es un 90% homóloga a la SEQ ID N.º 255, o a una variante de la misma que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido. Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o, en el caso de las versiones alargadas de dichos péptidos, a una molécula de la clase II.

En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX 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 L, et al. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Jul 17;98(15):8809-14; Zaremba S, et al. Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. Cancer Res. 1997 Oct 15;57(20): 4570-7; Colombetti S, et al. Impact of orthologous melan-A peptide immunizations on the anti-self melan-A/HLA-A2 T cell cross-reactivity. J Immunol. 2006 Jun 1;176(11):6560-7; Appay V, et al. Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. Eur J Immunol. 2006 Jul;36(7):1805-14).

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 indicada en la SEQ ID N.º 255. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de linfocitos T activados.

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía (Godkin A, et al. Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3. 2). Int Immunol. 1997 Jun;9(6):905-11) y de las bases de datos científicas (Rammensee H. et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999 Nov;50(3-4):213-9), 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 la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 255, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y será capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unión a moléculas MHC de clase I o II. Las variantes de la presente invención conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y matar a las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos 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.

Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el TCR 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.

También pueden ser adecuados péptidos más largos. También es posible que los epítopos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyan el epítopo real. 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 22 aminoácidos.

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

En una forma de realización preferida de la invención el péptido consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 255.

«Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a la SEQ ID N.º 255 o una variante de la misma contiene segmentos adicionales de aminoácidos localizados en los extremos N- y/o C-terminal que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un 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 parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo “Ii”) tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497. En otras fusiones, los péptidos de la presente invención se pueden fusionar con un anticuerpo tal y como se describe en la presente memoria, o con una parte funcional del mismo, en particular integrándolo en la secuencia

del anticuerpo, para que vayan dirigidos específicamente por dicho anticuerpo, o por ejemplo, con un anticuerpo que es específico para las células dendríticas tal y como se describe en la presente memoria.

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

En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos por Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, y que se incorporan en la presente memoria como referencia. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH2-NH, -CH2S-, -CH2CH2-, -CH=CH-, -COCH2-, -CH(OH)CH2- y -CH2SO-. La patente de EE. UU. 4. 897. 445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH_2-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de $NaCNBH_3$.

Péptidos que comprenden las secuencias descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos

hidrófobos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej. el grupo hidrófobo t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

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

De manera similar, un péptido o variante de la invención puede ser modificado químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005, que se incorpora en la presente memoria como referencia. La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido perfórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

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

La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro. El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico. Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los residuos de lisina y otros grupos 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 terapéuticas y péptidos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que la unión por entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos con fines de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamilación con cianato potásico.

Un péptido o variante que está modificado o que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contiene enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestran Lukas et al. (Solid-phase peptide synthesis under continuous-flow conditions. Proc Natl Acad Sci USA. May 1981; 78(5): 2791–2795) y las referencias citadas 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 el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en el de 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 (Nottingham, Reino Unido).

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

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

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

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

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

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

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen Saiki RK, et al. (Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med. 1988 Sep 1;319(9):537-41). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

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

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

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

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

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

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

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

La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva de la proteína muy elevados, de hasta 1 mg/l en células COS. En estirpes celulares menos potentes los niveles de proteínas suelen rondar ~0,1

mg/l. La presencia del origen de replicación del SV40 genera niveles elevados de replicación del ADN en células COS que toleran la replicación del SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden contener el origen pMB1 (derivado del pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen de la beta-lactamasa para la selección por resistencia a la ampicilina, hGH poliA, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la preprotripsina (PPT) pueden canalizar la secreción de las proteínas de fusión FLAG hacia el medio de cultivo, donde se pueden purificar por medio de anticuerpos anti-FLAG, resinas y placas. En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

En otra forma de realización dos o más péptidos o variantes peptídicas de la invención se codifican y se expresan en orden sucesivo (similar a constructos de «collar de cuentas»). Al hacerlo, los péptidos o los variantes peptídicas se pueden enlazar o fusionar juntas mediante segmentos de aminoácidos enlazantes, como por ejemplo LLLLLL, o se pueden unir sin ningún otro péptido adicional entre ellos. Estos constructos también pueden ser utilizados para la terapia contra el cáncer, y podrían inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE. UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (N.º ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general 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 transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

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

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

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene ácido prostático fosfatasa (PAP) fueron aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) de EE. UU. el 29 de abril de 2010 para el tratamiento del cáncer de próstata hormonorrefractario metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel–T) (Small EJ, et al. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. J Clin Oncol. 2006 Jul 1;24(19):3089-94. Rini et al. 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. 2006 Jul 1;107(1):67-74).

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

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

la inyección del ADN incluyen i. d. , i. m. , s. c. , i. p. e i. v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter et al 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 por tiempo suficiente para activar los linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo el antígeno un péptido conforme a la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

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

La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE.UU. con el N.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila Schneider line 2* está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Karre et al 1985. (Ljunggren, H. -G., and K. Karre. 1985. J. Exp. Med. 162:1745).

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.

De forma similar, si se utiliza como antígeno un epítopo de MHC de clase I, los linfocitos T serán linfocitos T 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 la SEQ ID N.º 255, o una secuencia de aminoácidos variante de la misma.

Existen otros métodos para generar linfocitos T *in vitro*. Por ejemplo, emplear linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al. (Induction of peptide-specific primary cytotoxic T lymphocyte responses from human peripheral blood. Eur J Immunol. 1995 Jun;25(6):1783-7) recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de linfocitos T. Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter et al. 2003 (Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J Immunol. 2003 Nov 15;171(10):4974-8) describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En la presente invención, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite desencadenar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidez alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben

incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad co-estimuladora como anticuerpos anti-CD28. Tales sistemas de aAPC también precisan a menudo el concurso de factores solubles adecuados, por ejemplo citocinas, como la interleucina-12.

Para la preparación de linfocitos T también se pueden utilizar células alogénicas; en WO 97/26328 se describe detalladamente un método que se incorpora a la presente memoria como referencia. Por ejemplo, además de células de *Drosophila* y de células T2, para presentar antígenos se pueden usar otras células tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras, células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo se pueden utilizar virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta et al. (1994) Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. Virology. 1994 Aug 1;202(2):949-55), que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).

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

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255.

Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interaccionando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo uniéndosele. Los linfocitos T son útiles en un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención y al cual se le administre un número eficaz de linfocitos T activados. Los linfocitos T que se le administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser linfocitos T autólogos. Otra alternativa consiste en que los linfocitos

T no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que dicho individuo esté sano. Por «individuo sano» los inventores entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que pueda detectarse mediante análisis.

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

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

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

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

Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos. Se pueden encontrar revisiones en: Gattinoni L, et al. Adoptive

immunotherapy for cancer: building on success. Nat Rev Immunol. 2006 May;6(5):383-93. Review. y Morgan RA, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science. 2006 Oct 6;314(5796):126-9).

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

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

estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítopos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 255 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

En otro aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 255, y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Se puede consultar una perspectiva general en, por ejemplo (Pascolo et al., Human peripheral blood mononuclear cells transfected with messenger RNA stimulate antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes in vitro. Cell Mol Life Sci. 2005 Aug;62(15):1755-62). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que

contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un 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 linfocitos T CD8-positivos y linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870. 893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de 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 The Yin and Yang of T cell costimulation. Science 1995 Nov 10;270(5238):932-3). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se las ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta

convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE. UU. N.º 5. 849. 589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich, 1996 Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells Nat Med. 1996 Oct;2(10):1096-103).

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

inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej. , AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, 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. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

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

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

En una forma de realización preferida la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores

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

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, sabores, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed., 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2112253, por ejemplo.

La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular del carcinoma hepatocelular (CHC) y de otras neoplasias malignas.

La presente invención también contempla un equipo que comprende:

(a) un envase con una composición farmacéutica como la descrita más arriba, en forma de solución o liofilizada;

(b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y

(c) opcionalmente, (I) instrucciones de uso de la solución o (II) de la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

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

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

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

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

Los equipos de la presente invención pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención,

acompañado o no de otros componentes (p. ej. , otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.

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

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

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

Puesto que los péptidos de la invención proceden de tejido tumoral relacionado con el CHC, el medicamento de la invención debe ser utilizado preferentemente para tratar el CHC.

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

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

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

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

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

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

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

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

Es importante tener presente que la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna conforme a la invención ataca el cáncer en diferentes estadios celulares y en diferentes estadios de desarrollo. Además se atacan diferentes vías de señalización relacionadas con el cáncer. Esto supone una ventaja con respecto a las vacunas que solo van dirigidas contra una o pocas dianas, que pueden permitir que el tumor se adapte con facilidad al ataque (evasión tumoral). Además, no todos los tumores expresan el mismo patrón de antígenos, por lo que la combinación de varios péptidos asociados a tumor asegura que el tumor en cuestión contenga al menos alguna de las dianas. La composición ha sido diseñado específicamente de modo tal que se espera que todo aquel tumor que sea positivo para HLA-A*02 y/o HLA-A*24 exprese varios de los antígenos y abarque varias vías independientes necesarias para el crecimiento y el mantenimiento del tumor. A la vista de los análisis experimentales que lo sustentan esto parece estar asegurado para cada uno de los subgrupos de péptidos específicos de los dos alelos HLA de clase I (A*02 y A*24). Así pues, la vacuna puede ser utilizada con facilidad sin atender a las indicaciones recogidas en la ficha técnica (*off-the-shelf*) para una población de pacientes más amplia. Esto significa que no será preciso ninguna otra evaluación de biomarcadores de la expresión de los antígenos aparte del tipado del HLA para seleccionar a los pacientes que acabarán siendo tratados con la vacuna, pero que, aun así, está asegurado que la respuesta inmunitaria estimulada atacará simultáneamente a varias dianas, lo que es importante para la eficacia (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

En otro aspecto, los péptidos son preseleccionados por su inmunogenicidad antes de ser incluidos en el archivo. A modo de ejemplo y sin ánimo de limitación, la inmunogenicidad

de los péptidos incluidos en el archivo se determina con un método que comprende la estimulación reiterada *in vitro* de linfocitos T CD8+ de donantes sanos con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con los complejos de péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28.

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

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

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

Preferentemente, los péptidos incluidos en la vacuna se identificarán con el método consistente en:(a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión; (b) comparación de los péptidos identificados con (a) un archivo (base de datos) de péptidos como el descrito antes; y (c) selección de al menos un péptido de la base de datos que presente correlación con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente. Por ejemplo, los TUMAP

presentados por la muestra del tumor se identifican mediante:(a1) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal del mismo tipo de tejido de la muestra tumoral para identificar proteínas que se sobreexpresen o se expresen de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Preferentemente, las secuencias de los ligandos MHC se identifican eluyendo los péptidos unidos de las moléculas MHC aisladas de la muestra tumoral y secuenciando los ligandos eluidos. Preferentemente, la muestra tumoral y el tejido normal se obtienen del mismo paciente.

Además, o como alternativa, a la selección de péptidos con el modelo del archivo (base de datos), los TUMAP también se pueden identificar en el paciente *de novo* e incluirse después en la vacuna. A modo de ejemplo, los TUMAP candidatos se pueden identificar en el paciente mediante (a) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal que corresponde al tipo de tejido de la muestra del tumor para identificar proteínas que se sobreexpresan o se expresan de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Como otro ejemplo, se pueden identificar proteínas portadoras de mutaciones que sean exclusivas de la muestra tumoral en comparación con el correspondiente tejido normal del paciente, así como encontrar TUMAP que permitan reconocer específicamente la mutación. Por ejemplo, el genoma del tumor y el del tejido normal correspondiente se pueden secuenciar mediante secuenciación hologenómica: Para descubrir mutaciones que no sean sinónimas en las regiones codificadoras de las proteínas de los genes, se extraen el ADN y el ARN genómicos de tejidos tumorales y el ADN genómico germinal normal y no mutado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La estrategia de secuenciación de nueva generación (NGS) aplicada queda limitada a la re-secuenciación

de las regiones codificantes de proteínas (re-secuenciación del exoma). Con este objeto, se captura el ADN exónico de muestras humanas con equipos de enriquecimiento dirigido suministrados por el proveedor y se procede a la secuenciación con p. ej. , un secuenciador HiSeq2000 (Illumina). Además, se secuencia el ARNm del tumor para determinar la cuantificación directa de la expresión génica y la validación de que los genes mutados se expresan en los tumores del paciente. Los millones de lecturas de secuencia resultantes se procesan con algoritmos informáticos. La lista de resultados contiene mutaciones y la expresión génica. Las mutaciones somáticas específicas del tumor se determinan comparándolas con las variaciones germinales derivadas de las PBMC y se priorizan. Los péptidos identificados *de novo* pueden ser analizados para determinar su inmunogenicidad según lo descrito antes con el archivo, y los TUMAP candidatos que posean la inmunogenicidad adecuada se escogen para la inclusión en la vacuna.

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

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

Una vez escogidos los péptidos para la vacuna basada en péptidos personalizados, se fabrica la vacuna. La vacuna preferentemente es una formulación líquida que contiene los péptidos disueltos en DMSO al 33%.

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

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

A continuación 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 como referencia en su integridad.

La presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255. Los ejemplos se refieren además a las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 254, y de la SEQ ID N.º 256 a la SEQ ID N.º 300 como ejemplos de referencia.

En las Figuras:

La Figura 1 muestra la sobrepresentación de varios péptidos en tejidos normales (gris oscuro) y en el CHC (gris claro). Figura 1A) APOB, Péptido: ALVDTLKFV (A*02) (SEQ ID N.º 7), tejidos de izquierda a derecha; 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 16 riñones, 4 muestras de leucocitos, 45 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 1 membrana serosa, 3 pieles, 4 bazos, 7 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 20 hígados; Figura 1B) ALDH1L1, Péptido: KLQAGTVFV (A*02) (SEQ ID N.º 2), tejidos de izquierda a derecha:1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 16 riñones, 4 leucocitos, 45 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 1 membrana serosa, 3 pieles, 4 bazos, 7 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas y 20 hígados; Figura 1C) C8B, Péptido: AYLLQPSQF (A*242 glándulas suprarrenales, 1 arteria, 4 cerebros, 1 mama, 5 colones, 1 corazón, 13 riñones, 9 pulmones, 3 páncreas, 2 rectos, 3 pieles, 1 bazo, 12 estómagos, 1 timo, 2 úteros y 9 hígados; Figura 1D) RAD23B, Péptido: KIDEKNFVV (SEQ ID N.º 63) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófagos; Figura 1E) RAD23B, Péptido: KIDEKNFVV (SEQ ID N.º 63), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 5 estirpes celulares, 1 tejido normal (1 glándula suprarrenal), 16 tejidos cancerosos (2 cánceres cerebrales, 4 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de recto, 1 cáncer de vejiga urinaria, 3 cánceres de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1F) RFNGRLPPDTLLQQV (SEQ ID N.º 92), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones,

2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófagos; Figura 1G) RFNG, Péptido: RLPPDTLLQQV (SEQ ID N.º 92), solo se exponen las muestras en que ha habido presentación del péptido: 2 estirpes celulares, 2 tejidos normales (2 glándulas suprarrenales), 17 tejidos cancerosos (1 cáncer cerebral, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de esófago, 5 cánceres hepáticos, 4 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de próstata, 2 cánceres de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1H) FLVCR1, Péptido: SVWFGPKEV (SEQ ID N.º 104) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófagos; Figura 1I) FLVCR1, Péptido: SVWFGPKEV (SEQ ID N.º 104), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 9 estirpes celulares, 1 tejido normal (1 intestino delgado), 16 tejidos cancerosos (1 cáncer cerebral, 1 cáncer de mama, 5 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de piel, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1J) IKBKAP, Péptido: LLFPHPVNQV (SEQ ID N.º 156) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófago; Figura 1K) IKBKAP, Péptido: LLFPHPVNQV (SEQ ID N.º 156), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 7 estirpes celulares, 2 cultivos primarios, 1 tejido normal (1 colon), 34 tejidos cancerosos (1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 2 cánceres de esófago, 2 leucemias leucocíticas, 4 cánceres hepáticos, 11

cánceres de pulmón, 3 cánceres de ganglio linfático, 5 cánceres de ovario, 4 cánceres de vejiga urinaria) (de izquierda a derecha); Figura 1L) NKD1, Péptido: FLDTPIAKV (SEQ ID N.º 47), 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroideas, 2 úteros, 2 venas, 4 esófago; Figura 1M) NKD1, Péptido: FLDTPIAKV (SEQ ID N.º 47), expone solo las muestras en que ha habido presentación del péptido: 1 de otra enfermedad (encefalocele), 2 tejidos normales (1 pulmón, 1 bazo), 35 tejidos cancerosos (5 cánceres cerebrales, 6 cánceres de colon, 1 cánceres de esófago, 6 cánceres hepáticos, 9 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de próstata, 4 cánceres de recto, 2 cánceres de estómago) (de izquierda a derecha).

La Figura 2 muestra perfiles de expresión a modo de ejemplo (expresión relativa comparada con el riñón normal) de genes originarios de la presente invención que están fuertemente sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el CHC en un conjunto de tejidos normales (gris oscuro) y de 12 muestras de CHC (gris). Figura 2A) APOB, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2B) AMACR, tejidos de izquierda a derecha:1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2C) ALDH1L1, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1

ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2D) FGG, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2E) C8B, tejidos de izquierda a derecha:1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; y Figura F) HSD17B6, tejidos de izquierda a derecha:1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero y 1 vena.

La Figura 3 muestra a título de ejemplo resultados de la citometría de flujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido. Véanse más explicaciones en el ejemplo 4.

La Figura 4 muestra a título de ejemplo resultados de la citometría de lujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido. Véanse más explicaciones en el ejemplo 4.

EJEMPLOS

La presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 255. Los ejemplos se refieren además a las secuencias

de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 254, y SEQ ID N.º 254 a SEQ ID N.º 300 como ejemplos de referencia.

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes procedían de la Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Tübinga, Alemania; Istituto Nazionale Tumori "Pascale". Struttura Complessa Biologia Molecolare e Oncogenesi Virale, Via Mariano, Nápoles, Italia; Bio-Options Inc., Brea, California, EE. UU; ProteoGenex Inc., Culver City, California, EE. UU.; Asterand Europe, Royston Herts, Reino Unido. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extirpación y permanecieron a -70 ºC o una temperatura inferior 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 et al., 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.

Análisis por espectrometría de masas

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema nanoAcquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 1,7 µm (Waters) aplicando un caudal de 400

nl por minuto. Posteriormente los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos fases con 10% al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente nano-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). Los espectrómetros de masas LTQ-Orbitrap se hicieron funcionar en el modo dependiente de datos con el método TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el orbitrap (R = 30 000), al que siguieron barridos EM/EM también en el orbitrap (R = 7500) con los 5 iones precursores más abundantes y exclusión dinámica de los iones preseleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia.

La cuantificación relativa por CL-EM sin marcaje se efectuó con recuento iónico, es decir, mediante la extracción y el análisis de las características mostradas por la CL-EM (Mueller et al. 2007a). El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron además con deconvolución del estado de carga y alineamiento del tiempo de retención (Mueller et al. 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 variación entre los duplicados técnicos y biológicos. De ese modo, cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo, todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra así como las variaciones de los duplicados. El perfil superpone muestras de CHC con muestras de tejido normal de referencia.

En la Figura 1 se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrerrepresentados a modo de ejemplo.

Los niveles de presentación de los péptidos indicados a título de ejemplo se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8:Grados de presentación. La tabla enumera los péptidos que en los tumores aparecen sobrepresentados en diversos grados con respecto a un grupo de tejidos normales: Muchísimo (+++), mucho (++) y más (+). S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	+++
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++
6	KLSPTVVGL	+++
7	ALVDTLKFV	+++
8	KLLEEATISV	+
9	ALANQKLYSV	+
10	SLLEEFDFHV	+++
11	SLSQELVGV	+
12	FLAELAYDL	+++
14	ALADLTGTVV	+++
15	LLYGHTVTV	+
16	SLLGGNIRL	++
17	RVAS*PTSGV	+
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
22	RIAGIRGIQGV	+++
23	RLYDPASGTISL	+
24	SLAEEKLQASV	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
26	SLLHTIYEV	+++
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLNSL	+++

29	YIQDEINTI	+++
30	YLGEGPRMV	++
31	YQMDIQQEL	++
32	ALNAVRLLV	+++
33	LLHGHIVEL	+
34	SLAEGTATV	+++
38	ALADVVHEA	+
39	ALDPKANFST	+++
40	ALLAEGITWV	+
42	ALLGGNVRMML	+++
44	ALQDAIRQL	+
47	FLDTPIAKV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
51	GLAEELVRA	+
52	GLFNAELLEA	+
53	GLIHLEGDTV	+++
54	GLLDPNVKSIFV	+++
55	GLYGRTIEL	+
56	GVLPGLVGV	+
57	HLTEAIQYV	++
58	ILADLNLSV	+
59	ILADTFIGV	++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	++
66	KLHEEIDRV	++
67	KLKETIQKL	+++
70	KLLDLETERILL	++
71	KLLDNWDSV	+++
72	KLSEAVTSV	+
75	KQMEPLHAV	+
76	LLADIGGDPFAA	+++
77	LLHEENFSV	+
79	LLLSTGYEA	+++
81	NLASFIEQVAV	++
82	NVFDGLVRV	+
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	+
86	RLAAFYSQV	+++
88	RLIDRIKTV	+++

89	RLIEEIKNV	+++
91	RLPDIPLRQV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+++
96	SLLEEPNVIRV	++
97	SLLPQLIEV	++
98	SLLSPEHLQYL	++
99	SLSAFLPSL	+++
101	SLWEGGVRGV	+++
103	SMGDHLWVA	+++
107	TLGQFYQEV	+++
108	TLLKKISEA	+++
109	TLYALSHAV	+
111	TVMDIDTSGTFNV	+
113	VLMDKLVEL	++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	+++
117	YAFPKSITV	+++
119	YLDKNLTVSV	+
120	YLGEEYVKA	+++
121	YLITGNLEKL	+
122	YLSQAADGAKVL	+++
123	YLWDLDHGFAGV	++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	++
127	VLIGSNHSL	+
128	GLAFSLNGV	+
129	SQADVIPAV	+
130	ALDAGAVYTL	++
131	ALDSGAFQSV	++
132	ALHEEVVGV	+
133	ALLEMDARL	+
134	ALLETNPYLL	++
135	ALLGKIEKV	+
137	ALPTVLVGV	++
139	ALSSKPAEV	+
142	AVIGGLIYV	++
144	FIQLITGV	+
146	FLWTEQAHTV	+
147	GLAPGGLAVV	+
148	GLFAPLVFL	+++

151	HLAKVTAEV	+
154	KLTDHLKYV	+
161	RLLDEQFAV	+
162	RLMSALTQV	++
163	RLTESVLYL	++
164	RMLIKLLEV	+
167	SLAESSFDV	++
168	SLAVLVPIV	+
169	SLFEWFHPL	+
170	SLHNGVIQL	+
171	SLIPAVLTV	+
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
174	TLAELGAVQV	+
176	TLGQIWDV	+
177	VLDEPYEKV	+
179	YIHNILYEV	++
180	YLGPHIASVTL	++
181	YLLEKFVAV	+
184	VVLDGGQIVTV	+
185	ALFPALRPGGFQA	++
186	VLLAQIIQV	+
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+
189	AFSPDSHYLLF	+++
190	RYNEKCFKL	+++
191	KYPDIISRI	++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+++
194	QYASRFVQL	+++
195	RYAPPPSFSEF	+++
196	AYLKWISQI	+++
197	RWPKKSAEF	+
198	LYWSHPRKF	+
200	AYLLQPSQF	+++
201	AYVNTFHNI	+++
202	AYGTYRSNF	+++
203	YYGILQEKI	+++
204	KYRLTYAYF	++
205	VYGLQRNLL	+
206	KWPETPLLL	+++

208	SYNPAENAVLL	++
210	AYPAIRYLL	++
211	IYIPSYFDF	++
212	VYGDVISNI	+++
213	YYNKVSTVF	+
214	IYVTSIEQI	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAIRQI	+
219	GVMAGDIYSV	+
220	SLLEKELESV	++
221	ALCEENMRGV	+
224	ALASVIKEL	+
225	KMDPVAYRV	+
226	AVLGPLGLQEV	+
227	ALLKVNQEL	+
228	YLITSVELL	++
229	KMFESFIESV	++
230	VLTEFTREV	+
231	RLFNDPVAMV	++
233	ALLGKLDAI	+
234	YLEPYLKEV	+
236	ALADKELLPSV	++
237	ALRGEIETV	+++
238	AMPPPPPQGV	++
239	FLLGFIPAKA	+
240	FLWERPTLLV	+++
241	FVLPLLGLHEA	++
242	GLFAPVHKV	+
243	GLLDNPELRV	+++
244	KIAELLENV	+
245	KLGAVFNQV	+
248	KLNDLIQRL	+
249	LLLGERVAL	+++
250	NLAEVVERV	++
251	RLFADILNDV	++
252	RTIEYLEEV	+
253	RVPPPPQSV	+
255	SLFGQDVKAV	+++
256	SLFQGVEFHYV	+
257	SLLEKAGPEL	+++
258	SLMGPVVHEV	+

260	TLMDMRLSQV	++
261	VLFQEALWHV	++
263	VLYPSLKEI	+
264	VMQDPEFLQSV	++
265	WLIEDGKVVTV	++
266	SLLESNKDLLL	+
267	ALNENINQV	+
268	KLYQEVEIASV	+
269	YLMEGSYNKV	+
270	SVLDQKILL	++
271	LLLDKLILL	+
272	QQLDSKFLEQV	+
273	AILETAPKEV	++
274	ALAEALKEV	+
275	ALIEGAGILL	++
276	ALLEADVNIKL	+
277	ALLEENSTPQL	+
278	ALTSVVVTL	+
279	ALWTGMHTI	+
281	GLLAGDRLVEV	+
282	GQFPSYLETV	++
283	ILSGIGVSQV	+
284	KLDAFVEGV	+
286	KVLDKVFRA	+
288	LLDDSLVSI	+
289	LLLEEGGLVQV	++
290	NLIDLDDLYV	++
292	RIPAYFVTV	+
293	FLASESLIKQI	++
295	SLFSSPPEI	++
297	TLFYSLREV	+
298	TMAKESSIIGV	++
299	ALLRVTPFI	+
301	VLADFGARV	+++
302	KIQEILTQV	+++
303	GVYDGEEHSV	+
304	SLIDQFFGV	+++
305	GVLENIFGV	+
308	ALLRTVVSV	+
309	GLIEIISNA	+
310	SLWGGDVVL	+

311	FLIPIYHQV	+
312	RLGIKPESV	+++
313	LTAPPEALLMV	+
314	YLAPFLRNV	+
315	KVLDGSPIEV	+
316	LLREKVEFL	+
317	KLPEKWESV	++
318	KLNEINEKI	+
319	KLFNEFIQL	+
320	GLADNTVIAKV	+
322	ILYDIPDIRL	+
324	RLFETKITQV	++
326	ALSDGVHKI	++
327	GLNEEIARV	++
328	RLEEDDGDVAM	+
329	SLIEDLILL	+++
330	SMSADVPLV	++
332	AMLAVLHTV	+
334	SILTIEDGIFEV	+
335	SLLPVDIRQYL	++
336	YLPTFFLTV	+
337	TLLAAEFLKQV	+
338	KLFDSDPITVTV	+++
340	KVFDEVIEV	+
342	AMSSKFFLV	+
343	LLLPDYYLV	+
345	SYNPLWLRI (A*24)	+++
346	LYQILQGIVF (A*24)	+++
347	ALNPADITV	+

EJEMPLO 2

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

La sobrepresentación o la presentación específica de un péptido en las células tumorales con respecto a las células normales es suficiente para que sea de utilidad en la inmunoterapia, y algunos péptidos son específicos de tumor aunque la proteína de la que proceden esté presente también en los tejidos normales. Además, la obtención de los perfiles de expresión del ARNm añade otro nivel de seguridad a la selección de las dianas

peptídicas para la inmunoterapia. Concretamente para las opciones terapéuticas sujetas a un alto riesgo de seguridad, como los TCR madurados por afinidad, el péptido diana ideal será todo aquel derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no se halle en los tejidos normales.

Fuentes de ARN y preparación

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

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

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

Experimentos con micromatrices

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2. 0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA

Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2. 0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2. 0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes 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 normal de riñón 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 que se expresan exclusivamente en el CHC. Los grados de expresión de otros genes mostrados a título de ejemplo se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9: Grados de expresión. La tabla enumera los péptidos derivados de genes que en los tumores aparecen sobrepresentados en diversos grados con respecto a un grupo de tejidos normales: Muchísimo (+++), mucho (++) y más (+).

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión génica
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	++
3	ILDDNMQKL	+
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++
7	ALVDTLKFV	+++
10	SLLEEFDFHV	+
13	GLIDTETAMKAV	+++
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
27	TLPDFRLPEI	+++

28	TLQDHLNSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
31	YQMDIQQEL	+++
38	ALADVVHEA	+
39	ALDPKANFST	+
41	ALLELDEPLVL	+++
42	ALLGGNVRMML	+
44	ALQDAIRQL	+
45	ALQDQLVLV	++
46	AMAEMKVVL	++
48	FLLEQPEIQV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
50	FTIPKLYQL	+++
52	GLFNAELLEA	+++
53	GLIHLEGDTV	+++
55	GLYGRTIEL	+++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	+
66	KLHEEIDRV	+++
67	KLKETIQKL	+++
68	KLLAATVLLL	+++
73	KLTLVIISV	+++
74	KLYDLELIV	+++
76	LLADIGGDPFAA	+
81	NLASFIEQVAV	+
82	NVFDGLVRV	+++
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	++
87	RLFEENDVNL	+++
90	RLLDVLAPLV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+
95	SICNGVPMV	++
97	SLLPQLIEV	+++
100	SLVGDIGNVNM	+++
103	SMGDHLWVA	+
105	SVYDGKLLI	+
106	TLAAIIHGA	++
107	TLGQFYQEV	+++

109	TLYALSHAV	+++
110	TVGGSEILFEV	+++
113	VLMDKLVEL	+++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	++
117	YAFPKSITV	+
119	YLDKNLTVSV	++
120	YLGEEYVKA	+++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	+++
129	SQADVIPAV	++
130	ALDAGAVYTL	++
132	ALHEEVVGV	++
141	AMGEKSFSV	+
142	AVIGGLIYV	+++
145	FLIAEYFEHV	++
146	FLWTEQAHTV	++
148	GLFAPLVFL	+
149	GLLSGLDIMEV	+++
154	KLTDHLKYV	+++
157	QLLPNLRAV	+
158	RIISGLVKV	++
160	RLLAKIICL	+++
163	RLTESVLYL	++
165	RVIEHVEQV	++
168	SLAVLVPIV	+++
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
175	TLFEHLPHI	++
177	VLDEPYEKV	++
182	YLLHFPMAL	+++
183	YLYNNEEQVGL	+++
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+
200	AYLLQPSQF	+++
204	KYRLTYAYF	+++
206	KWPETPLLL	+
215	IYTGNISSF	+++
217	DYIPYVFKL	+++

218	VYQGAIRQI	+++
228	YLITSVELL	+
233	ALLGKLDAI	+
249	LLLGERVAL	+
255	SLFGQDVKAV	+
259	TLITDGMRSV	+
263	VLYPSLKEI	+
273	AILETAPKEV	+
275	ALIEGAGILL	+
286	KVLDKVFRA	+
296	SLLSGRISTL	+
298	TMAKESSIIGV	+
301	VLADFGARV	++
302	KIQEILTQV	+
315	KVLDGSPIEV	++
318	KLNEINEKI	+++
320	GLADNTVIAKV	+
324	RLFETKITQV	++
327	GLNEEIARV	+
336	YLPTFFLTV	+
341	YLAIGIHEL	++
345	SYNPLWLRI (A*24)	++

EJEMPLO 3: Intercambio de ligandos por UV/Unión de péptidos a HLA-A*02 y HLA-A*24

Los péptidos candidatos para los tratamientos con linfocitos T acordes con la presente invención se sometieron a nuevos análisis para determinar su capacidad de unión a MHC (afinidad). Los diferentes complejos de péptido-MHC se produjeron con intercambio de ligandos por UV, técnica en la que un péptido sensible a los rayos UV se escinde tras exponerlo a dicha radiación y se intercambia por el péptido de interés que se pretende analizar. Sólo los candidatos peptídicos que pueden unirse y estabilizar las moléculas de MHC receptoras del péptido evitan la disociación de los complejos MHC. Para determinar el rendimiento de la reacción de intercambio se llevó a cabo un ELISA basado en la detección de la cadena liviana (β2m) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo siguiendo la descripción general de Rodenko y cols. (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 4 veces y se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con un tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Como patrones se emplearon monómeros HLA-A*0201/MLA-001 replegados, en el intervalo de 15 a 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC resultantes de la reacción de intercambio por UV se diluyeron a 1:100 con tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con anticuerpo anti-β2m conjugado con HRP 2 µg/ml durante 1 h a 37 °C, se lavaron de nuevo y se revelaron con solución de TMB que se detuvo con $NH2SO_4$. La absorción se midió a 450 nm. Los péptidos candidatos que presentan un rendimiento de intercambio elevado (preferentemente superior al 50% y más preferentemente superior al 70%) se prefieren en general para la generación y la producción de anticuerpos o de fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o de fragmentos funcionales de los mismos, ya que muestran la suficiente avidez hacia las moléculas MHC y evitan la disociación de los complejos MHC.

Tabla 10A: Niveles de unión a MHC de clase I

<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 %= +++; >= 75 % = ++++

SEQ ID	Código del péptido	Intercambio del péptido
12	GPC3-001	++++
5	APOB-001	++++
7	APOB-002	++++
1	APOB-003	++++
13	HSD11B1-001	++++
227	SAMM-001	++++
4	APOB-004	++++
232	MAPKAPK5-001	++++
10	USO-001	++++
304	USP14-001	++++
219	ADF-012	++++

223	IDI1-001	++++
224	IFT81-001	++++
14	NCST-001	++++
228	ACSL4-001	++++
230	IPO9-001	++++
15	SLC35B2-001	++++
16	ACSL3-001	++++
303	MAGEB2-001	+++
226	THT-001	+++
8	DYM-001	+++
6	AXIN2-001	+++
225	QAR-001	+++
2	ALDH1L1-001	+++
221	EEF2-001	+++
220	DRG2-001	+++
301	C1QTNF3-001	+++
11	ZNF318-001	+++

Tabla 10B: Niveles de unión a MHC de clase I

La unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I a HLA-A*02 o a HLA-A*24 según su secuencia peptídica se clasificó en función del rendimiento del intercambio del péptido: ≥10% = +; ≥20% = ++; ≥50 = +++; ≥ 75% = ++++. S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
1	VMAPFTMTI	"++++"
2	KLQAGTVFV	"+++"
3	ILDDNMQKL	"+++"
4	KLQDFSDQL	"++++"
5	ALVEQGFTV	"++++"
6	KLSPTVVGL	"+++"
7	ALVDTLKFV	"++++"
8	KLLEEATISV	"+++"
9	ALANQKLYSV	"+++"
10	SLLEEFDFHV	"++++"
11	SLSQELVGV	"+++"
12	FLAELAYDL	"++++"
13	GLIDTETAMKAV	"++++"
14	ALADLTGTVV	"++++"
15	LLYGHTVTV	"++++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
16	SLLGGNIRL	"++++"
17	RVAS*PTSGV	"+++"
18	ALYGKTEVV	"+++"
19	FLEETKATV	"+++"
20	KLSNVLQQV	"++++"
21	QLIEVSSPITL	"++++"
22	RIAGIRGIQGV	"++++"
23	RLYDPASGTISL	"+++"
24	SLAEEKLQASV	"+++"
25	SLDGKAALTEL	"+++"
26	SLLHTIYEV	"+++"
27	TLPDFRLPEI	"++++"
28	TLQDHLNSL	"+++"
29	YIQDEINTI	"+++"
30	YLGEGPRMV	"+++"
31	YQMDIQQEL	"+++"
32	ALNAVRLLV	"++++"
33	LLHGHIVEL	"+++"
34	SLAEGTATV	"+++"
35	SLQESILAQV	"+++"
36	ILNVDGLIGV	"+++"
37	LLLPLLPPLSP	"+++"
38	ALADVVHEA	"+++"
39	ALDPKANFST	"+++"
40	ALLAEGITWV	"+++"
41	ALLELDEPLVL	"++++"
42	ALLGGNVRMML	"+++"
43	ALLGVWTSV	"++"
44	ALQDAIRQL	"++++"
45	ALQDQLVLV	"++++"
46	AMAEMKVVL	"+++"
47	FLDTPIAKV	"++"
48	FLLEQPEIQV	"+++"
49	FLYPEKDEPT	"++"
50	FTIPKLYQL	"++"
51	GLAEELVRA	"++"
52	GLFNAELLEA	"+++"
53	GLIHLEGDTV	"+++"
54	GLLDPNVKSIFV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
55	GLYGRTIEL	"+++"
56	GVLPGLVGV	"+++"
57	HLTEAIQYV	"+++"
58	ILADLNLSV	"++++"
59	ILADTFIGV	"+++"
60	ILSPLSVAL	"++++"
61	KIADFELPTI	"++++"
62	KIAGTNAEV	"++"
63	KIDEKNFVV	"+++"
64	KILEETLYV	"+++"
65	KLFSGDELLEV	"+++"
66	KLHEEIDRV	"+++"
67	KLKETIQKL	"+++"
68	KLLAATVLLL	"++"
69	KLLDEVTYLEA	"++++"
70	KLLDLETERILL	"++++"
71	KLLDNWDSV	"++++"
72	KLSEAVTSV	"+++"
74	KLYDLELIV	"+++"
75	KQMEPLHAV	"++"
76	LLADIGGDPFAA	"+++"
77	LLHEENFSV	"+++"
78	LLIDDEYKV	"+++"
80	LLYEGKLTL	"++++"
81	NLASFIEQVAV	"+++"
82	NVFDGLVRV	"+++"
83	QLHDFVMSL	"++++"
84	QLTPVLVSV	"+++"
85	RILPKVLEV	"+++"
86	RLAAFYSQV	"+++"
87	RLFEENDVNL	"+++"
88	RLIDRIKTV	"++"
89	RLIEEIKNV	"++"
90	RLLDVLAPLV	"+++"
91	RLPDIPLRQV	"+++"
92	RLPPDTLLQQV	"+++"
93	RLYTMDGITV	"++"
94	RMSDVVKGV	"+++"
95	SICNGVPMV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
96	SLLEEPNVIRV	"++++"
97	SLLPQLIEV	"++++"
98	SLLSPEHLQYL	"+++"
99	SLSAFLPSL	"++++"
100	SLVGDIGNVNM	"++"
101	SLWEGGVRGV	"+++"
102	SLWSVARGV	"+++"
103	SMGDHLWVA	"+++"
104	SVWFGPKEV	"+++"
105	SVYDGKLLI	"++++"
106	TLAAIIHGA	"+++"
107	TLGQFYQEV	"++++"
108	TLLKKISEA	"+++"
109	TLYALSHAV	"+++"
110	TVGGSEILFEV	"++++"
111	TVMDIDTSGTFNV	"+++"
112	VLGEVKVGV	"++++"
113	VLMDKLVEL	"++++"
114	VLSQVYSKV	"+++"
115	VVLDDKDYFL	"+++"
116	WVIPAISAV	"++++"
117	YAFPKSITV	"+++"
118	YLDDEKNWGL	"+++"
119	YLDKNLTVSV	"+++"
120	YLGEEYVKA	"++"
121	YLITGNLEKL	"+++"
122	YLSQAADGAKVL	"++"
123	YLWDLDHGFAGV	"+++"
124	LLIDVVTYL	"++++"
125	ALYGRLEVV	"++++"
126	TLLDSPIKV	"+++"
127	VLIGSNHSL	"++++"
128	GLAFSLNGV	"++++"
129	SQADVIPAV	"+++"
130	ALDAGAVYTL	"++++"
131	ALDSGAFQSV	"+++"
132	ALHEEVVGV	"+++"
133	ALLEMDARL	"+++"
134	ALLETNPYLL	"++++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
135	ALLGKIEKV	"+++"
136	ALLNQHYQV	"+++"
137	ALPTVLVGV	"++++"
138	ALSQVTLLL	"++++"
139	ALSSKPAEV	"+++"
140	ALTSISAGV	"++++"
141	AMGEKSFSV	"++++"
142	AVIGGLIYV	"++++"
145	FLIAEYFEHV	"++"
146	FLWTEQAHTV	"++"
147	GLAPGGLAVV	"+++"
148	GLFAPLVFL	"++++"
149	GLLSGLDIMEV	"++++"
150	GLSNLGIKSI	"++++"
151	HLAKVTAEV	"+++"
152	KLDNNLDSV	"+++"
154	KLTDHLKYV	"+++"
156	LLFPHPVNQV	"++++"
157	QLLPNLRAV	"+++"
158	RIISGLVKV	"++"
159	RLFPDGIVTV	"+++"
160	RLLAKIICL	"++"
161	RLLDEQFAV	"+++"
162	RLMSALTQV-	"++"
163	RLTESVLYL	"+++"
164	RMLIKLLEV	"+++"
165	RVIEHVEQV	"++++"
166	SILDIVTKV	"+++"
167	SLAESSFDV	"+++"
168	SLAVLVPIV	"+++"
169	SLFEWFHPL	"+++"
170	SLHNGVIQL	"+++"
171	SLIPAVLTV	"+++"
172	SLLNFLQHL	"+++"
173	SLTSEIHFL	"+++"
174	TLAELGAVQV	"+++"
175	TLFEHLPHI	"+++"
176	TLGQIWDV	"++++"
177	VLDEPYEKV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
178	YIFTTPKSV	"+++"
179	YIHNILYEV	"++++"
180	YLGPHIASVTL	"+++"
181	YLLEKFVAV	"+++"
182	YLLHFPMAL	"+++"
183	YLYNNEEQVGL	"++"
184	VVLDGGQIVTV	"+++"
185	ALFPALRPGGFQA	"+++"
186	VLLAQIIQV	"+++"
187	SYPTFFPRF	"++++"
188	RYSAGWDAKF	"++++"
189	AFSPDSHYLLF	"+++"
190	RYNEKCFKL	"++++"
191	KYPDIISRI	"++++"
192	SYITKPEKW	"++++"
193	IYPGAFVDL	"++++"
195	RYAPPPSFSEF	"++++"
196	AYLKWISQI	"++++"
197	RWPKKSAEF	"++++"
198	LYWSHPRKF	"++++"
199	KFVTVQATF	"++++"
200	AYLLQPSQF	"++++"
201	AYVNTFHNI	"++++"
202	AYGTYRSNF	"++++"
203	YYGILQEKI	"++++"
205	VYGLQRNLL	"++++"
206	KWPETPLLL	"++++"
207	IYLERFPIF	"++++"
208	SYNPAENAVLL	"++++"
209	VFHPRQELI	"+++"
210	AYPAIRYLL	"++++"
211	IYIPSYFDF	"++++"
212	VYGDVISNI	"++++"
213	YYNKVSTVF	"++++"
214	IYVTSIEQI	"++++"
215	IYTGNISSF	"++++"
216	IYADVGEEF	"++++"
217	DYIPYVFKL	"++++"
218	VYQGAIRQI	"++++"
219	GVMAGDIYSV	"++++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
220	SLLEKELESV	"+++"
221	ALCEENMRGV	"+++"
222	LTDITKGV	"++"
223	FLFNTENKLLL	"++++"
224	ALASVIKEL	"+++"
225	KMDPVAYRV	"+++"
226	AVLGPLGLQEV	"+++"
227	ALLKVNQEL	"++++"
228	YLITSVELL	"++++"
229	KMFESFIESV	"+++"
230	VLTEFTREV	"++++"
231	RLFNDPVAMV	"++++"
232	KLAEIVKQV	"++++"
233	ALLGKLDAI	"++++"
234	YLEPYLKEV	"++++"
235	KLFEEIREI	"++++"
236	ALADKELLPSV	"+++"
237	ALRGEIETV	"+++"
238	AMPPPPPQGV	"++"
239	FLLGFIPAKA	"+++"
240	FLWERPTLLV	"+++"
241	FVLPLLGLHEA	"++"
242	GLFAPVHKV	"+++"
243	GLLDNPELRV	"+++"
244	KIAELLENV	"++++"
245	KLGAVFNQV	"++++"
246	KLISSYYNV	"+++"
247	KLLDTMVDTFL	"++++"
248	KLNDLIQRL	"+++"
249	LLLGERVAL	"++++"
250	NLAEVVERV	"++++"
251	RLFADILNDV	"++++"
252	RTIEYLEEV	"+++"
253	RVPPPPQSV	"++"
254	RVQEAIAEV	"+++"
255	SLFGQDVKAV	"+++"
256	SLFQGVEFHYV	"+++"
257	SLLEKAGPEL	"+++"
258	SLMGPVVHEV	"+++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
259	TLITDGMRSV-	"++"
260	TLMDMRLSQV	"+++"
261	VLFQEALWHV	"+++"
262	VLPNFLPYNV	"+++"
263	VLYPSLKEI	"+++"
264	VMQDPEFLQSV	"++++"
265	WLIEDGKVVTV	"++++"
266	SLLESNKDLLL	"+++"
267	ALNENINQV	"+++"
268	KLYQEVEIASV	"++++"
269	YLMEGSYNKV	"+++"
270	SVLDQKILL	"+++"
271	LLLDKLILL	"++++"
272	QQLDSKFLEQV	"+++"
273	AILETAPKEV	"+++"
274	ALAEALKEV	"++++"
275	ALIEGAGILL	"+++"
276	ALLEADVNIKL	"++++"
277	ALLEENSTPQL	"+++"
278	ALTSVVVTL	"++++"
279	ALWTGMHTI	"+++"
280	ATLNIIHSV	"+++"
281	GLLAGDRLVEV	"+++"
282	GQFPSYLETV	"+++"
283	ILSGIGVSQV	"+++"
284	KLDAFVEGV	"+++"
285	KLLDLSDSTSV	"+++"
286	KVLDKVFRA	"++++"
287	LIGEFLEKV	"++++"
288	LLDDSLVSI	"+++"
290	NLIDLDDLYV	"++++"
291	QLIDYERQL	"+++"
292	RIPAYFVTV	"++"
293	FLASESLIKQI	"++"
294	RLIDLHTNV	"++++"
295	SLFSSPPEI	"+++"
296	SLLSGRISTL	"+++"
297	TLFYSLREV	"+++"
298	TMAKESSIIGV	"++"

SEQ ID N.º	Secuencia	Intercambio del péptido
299	ALLRVTPFI	"+++"
300	TLAQQPTAV	"++"
302	KIQEILTQV	"++++"

EJEMPLO 4

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

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, los inventores llevaron a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de linfocitos T basado en estimulaciones reiteradas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo los inventores han podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 22 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 de la invención, lo cual demuestra que estos péptidos son epítopos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en humanos (Tabla 11).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

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

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

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

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

Los pMHC usados en las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A modificado/MART-1) 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 placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente $1x10^6$ linfocitos T CD8+ con $2x10^5$ microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Para la lectura de los multímeros pMHC con 8 moléculas pMHC distintas por condición se empleó una estrategia de codificación combinatoria bidimensional según lo descrito en otro lugar (Andersen et al., 2012), con pequeñas modificaciones que comprenden el acoplamiento con 5 fluorocromos distintos. Por último, los análisis de los multímeros se llevaron a cabo tiñendo las células con el colorante vital Live/dead® del IR cercano (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con

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

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de CHC

En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En la Figura 3 y la Figura 4 se muestran a título de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de tres péptidos de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 22 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 11A.

Tabla 11A: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I de la invención

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

SEQ ID	ID del péptido	Pocillos	Donantes
225	QAR-001	+++	++++
1	APOB-003	++	++++
2	ALDH1L1-001	++	++++
301	C1QTNF3-001	++	++++
15	SLC35B2-001	++	++++
16	ACSL3-001	++	++++
12	GPC3-001	+	++++

7	APOB-002	+	++++
303	MAGEB2-001	+	++
227	SAMM-001	+	+++
4	APOB-004	+	++++
226	THT-001	+	++++
6	AXIN2-001	+	++
232	MAPKAPK5-001	+	+++
10	USO-001	+	++
304	USP14-001	+	++++
219	ADF-012	+	++++
224	IFT81-001	+	+++
11	ZNF318-001	+	++
14	NCST-001	+	++
228	ACSL4-001	+	++
230	IPO9-001	+	++++

Tabla 11B: Inmunogenicidad *in vitro* de otros péptidos adicionales de HLA clase I que forman parte de la invención

Resultados a título de ejemplo de experimentos de inmunogenicidad *in vitro* efectuados por el solicitante con los péptidos restringidos a HLA-A*24 de la invención. Se muestran los resultados de la inmunogenicidad *in vitro*. Los porcentajes de pocillos y de donantes positivos (evaluables) se resumen del modo siguiente: 1-20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 %= +++; >= 70 %= ++++

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]	Donantes positivos [%]
187	SYPTFFPRF	"+"	"++++"
189	AFSPDSHYLLF	"+"	"++"
190	RYNEKCFKL	"+"	"++"
191	KYPDIISRI	"+"	"++++"
192	SYITKPEKW	"+"	"+++"
193	IYPGAFVDL	"+"	"+++"
194	QYASRFVQL	"+"	"+++"
196	AYLKWISQI	"+"	"+++"
197	RWPKKSAEF	"+"	"++"
198	LYWSHPRKF	"+"	"++"
199	KFVTVQATF	"+"	"++"
201	AYVNTFHNI	"++"	"++++"

202	AYGTYRSNF	"+"	"++++"
203	YYGILQEKI	"+"	"+++"
205	VYGLQRNLL	"+"	"+++"
207	IYLERFPIF	"++"	"++++"
208	SYNPAENAVLL	"+"	"+++"
209	VFHPRQELI	"++"	"++++"
210	AYPAIRYLL	"+"	"++++"
211	IYIPSYFDF	"++"	"++++"
212	VYGDVISNI	"+"	"++++"
215	IYTGNISSF	"+"	"++"
216	IYADVGEEF	"+"	"++"
217	DYIPYVFKL	"+++"	"++++"
218	VYQGAIRQI	"+"	"+++"

Resultados a título de ejemplo de respuestas *in vitro* de linfocitos T CD8+ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-A*02+ (Figura 3)

A los linfocitos T CD8+ se los estimuló con APC artificiales tapizadas con el AcM anti-CD28 y el HLA-A*02 acomplejado con los péptidos IMA-APOB-002 (SEQ ID N.º 7) (A, panel derecho) o IMA-APOB-003 (B, panel derecho, SEQ ID N.º 1), o IMA-ALDH1L1-001 (C, panel derecho, SEQ ID N.º 2), respectivamente. Luego de tres ciclos de estimulación, la detección de las células reactivas al péptido se efectuó mediante la tinción con multímeros en 2D con A*02/ APOB-002 (A) o A*02/ APOB-003 (B), o A*02/ALDH1L1-001. Los paneles de la izquierda (A, B, C) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos de A*02/péptido irrelevantes. Las subpoblaciones adecuadas de linfocitos CD8+ se seleccionaron entre los singletes celulares viables. Las selecciones booleanas ayudaron a excluir los falsos positivos detectados con multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

Resultados a título de ejemplo de respuestas *in vitro* de linfocitos CD8+ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-A*24+ (Figura 4)

A los linfocitos T CD8+ se los estimuló con APC artificiales tapizadas con el AcM anti-CD28 y HLA-A*24 acomplejado con los péptidos IMA-KLHL24-001 (SEQ ID N.º 190) (A, panel derecho) o IMA-APOB-006 (B, panel derecho, SEQ ID N.º 218), respectivamente.

Luego de tres ciclos de estimulación, la detección de las células reactivas al péptido se efectuó mediante la tinción con multímeros en 2D con A*24/ KLHL24-001 (A) o A*24/ APOB-006 (B). Los paneles izquierdos (A y B) presentan la tinción de control de células estimuladas con complejos de A*24/péptido irrelevantes. Las subpoblaciones adecuadas de linfocitos CD8+ se seleccionaron entre los singletes celulares viables. Las selecciones booleanas ayudaron a excluir los falsos positivos detectados con multímeros específicos de diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

EJEMPLO 5: Síntesis de péptidos

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

Lista de referencias bibliográficas

Adler, A. S. et al., Genes Dev. **28** (2014)

Ahn, Y. H. et al., J Proteomics. **106** (2014)

Akiyama, H. et al., Oncol Rep. **21** (2009)

Alam, S. M. et al., Endocr. Relat Cancer **16** (2009)

Aleman, G. et al., Am J Physiol Endocrinol. Metab **289** (2005)

Alexanian, A. et al., Cancer Genomics Proteomics. **9** (2012)

Altenhofer, S. et al., J Biol. Chem. **285** (2010)

Alvarez, C. et al., J Biol. Chem. **276** (2001)

Ammerpohl, O. et al., Int. J Cancer **130** (2012)

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

Arai, E. et al., Carcinogenesis **33** (2012)

Araki, T. et al., J Biol. Chem. **286** (2011)

Arlt, A. et al., Oncogene **28** (2009)

Arndt, S. et al., Oncol Rep. **18** (2007)

Arner, E. S. et al., Eur. J Biochem. **267** (2000)

Atienza, J. M. et al., Mol Cancer Ther **4** (2005)

Avery-Kiejda, K. A. et al., BMC. Cancer **14** (2014)

Bachmann, S. B. et al., Mol Cancer **13** (2014)

Balogh, K. et al., Oncogene **31** (2012)

Bani, M. R. et al., Mol Cancer Ther **3** (2004)

Bansal, N. et al., PLoS. One. **6** (2011)

Barbarulo, A. et al., Oncogene **32** (2013)

Bell, J. C. et al., Drug Metab Dispos. **40** (2012)

Ben-Izhak, O. et al., Histopathology **41** (2002)

Bergada, L. et al., Lab Invest **94** (2014)

Bergeron, M. J. et al., Mol Aspects Med. **34** (2013)

Bhattacharya, C. et al., Mol Cancer **11** (2012)

Bhogaraju, S. et al., Science **341** (2013)

Bidkhori, G. et al., PLoS. One. **8** (2013)

Bieche, I. et al., Breast Cancer Res **6** (2004)

Biswas, S. et al., Biochim. Biophys. Acta **1832** (2013)

Blanke, K. L. et al., Cancer Causes Control **25** (2014)

Bodine, S. C. et al., Science **294** (2001)

Boehringer, J. et al., Biochem. J **448** (2012)

Bojjireddy, N. et al., J Cell Sci. (2014)

Booth, D. G. et al., EMBO J **30** (2011)

Bouquet, C. et al., Mol Ther **14** (2006)

Boylan, K. L. et al., Proteome. Sci. **8** (2010)

Braumuller, H. et al., Nature (2013)

Brockmoller, S. F. et al., J Proteome. Res **11** (2012)

Buch, S. C. et al., Mol Carcinog. **51 Suppl 1** (2012)

Bull, C. et al., Cancer Res **74** (2014)

Burrell, R. A. et al., Nature **494** (2013)

Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res **12** (2006)

Butterfield, L. H. et al., Clin. Cancer Res. **9** (2003)

Byrne, A. et al., Exp. Cell Res **316** (2010)

Cadenas, C. et al., Cell Cycle **13** (2014)

Cadoret, A. et al., Oncogene **21** (2002)

Cao, H. et al., Biochemistry **41** (2002)

Cao, Y. et al., Cancer Research **61** (2001)

Cao-Ehlker, X. et al., J Biol. Chem. **288** (2013)

Carroll, M. et al., J Interferon Cytokine Res **33** (2013)

Carrouel, F. et al., J Dent. Res **87** (2008)

Castro, M. et al., J Transl. Med. **8** (2010)

Chae, Y. S. et al., Med. Oncol **28** (2011)

Chang, L. O. et al., Cancer Res **33** (1973)

Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother. Pharmacol. **59** (2007)

Chapiro, J. et al., Radiol. Med. **119** (2014)

Charbonneau, B. et al., Am J Hematol. **87** (2012)

Chatterjee, M. et al., Haematologica **98** (2013)

Chen, J. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **420** (2012a)

Chen, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **108** (2011a)

Chen, R. et al., World J Gastroenterol. **17** (2011b)

Chen, X. et al., J Dig. Dis. **12** (2011c)

Chen, X. Q. et al., Med. Oncol **29** (2012b)

Cheng, L. et al., Genomics **102** (2013)

Choi, Y. W. et al., Int. J Gynecol. Cancer **17** (2007)

Christa, L. et al., Gastroenterology **106** (1994)

Clark, A. G. et al., Cytoskeleton (Hoboken.) **69** (2012)

Claro da, Silva T. et al., Mol. Aspects Med. **34** (2013)

Cohen, L. et al., Nature **395** (1998)

Collins, C. L. et al., Surgery **122** (1997)

Com, E. et al., J Proteomics. **75** (2012)

Copps, K. D. et al., Diabetologia **55** (2012)

Cornen, S. et al., PLoS. ONE. **9** (2014)

Cornez, I. et al., Biochem. Pharmacol. **75** (2008)

Cowling, V. H. , Oncogene **29** (2010)

Cui, T. et al., Int. J Oncol **39** (2011)

da Silva, M. G. et al., Exp. Clin Cardiol. **17** (2012)

Dadkhah, E. et al., Arch. Iran Med. **16** (2013)

Darmanis, S. et al., PLoS. One. **8** (2013)

Darvekar, S. et al., Biochem. J **442** (2012)

Darvekar, S. R. et al., PLoS. One. **9** (2014)

Datta, K. et al., J Biol. Chem. **284** (2009)

David, S. et al., Front Biosci. (Elite. Ed) **5** (2013)

de Almagro, M. C. et al., Biochem. Pharmacol. **81** (2011)

de Groot, J. F. et al., Cancer Res **65** (2005)

Deb, S. et al., Br. J Cancer **110** (2014)

Debauve, G. et al., Cell Mol Life Sci. **65** (2008)

Decker, T. et al., J Clin Invest **109** (2002)

Decock, A. et al., Genome Biol. **13** (2012)

Del Campo, E. M. et al., Mol Phylogenet. Evol. **66** (2013)

Delaval, B. et al., J Cell Biol. **188** (2010)

Deng, X. D. et al., Asian Pac. J Cancer Prev. **15** (2014)

Di, Gregorio E. et al., J Med. Genet. **50** (2013)

Diggle, C. P. et al., PLoS. Genet. **10** (2014)

Dimitrov, A. et al., Hum. Mol Genet. **18** (2009)

Dmitriev, O. Y. , Biochem. Cell Biol. **89** (2011)

Doherty, J. A. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **20** (2011)

Dong, Z. et al., Crit Rev. Oncol Hematol. **59** (2006)

Dou, R. et al., Cancer Lett. **336** (2013)

Drazkowska, K. et al., Nucleic Acids Res **41** (2013)

Edavana, V. K. et al., Drug Metab Dispos. **41** (2013)

Edwards, P. A. et al., Breast Cancer Res **14** (2012)

Elvenes, J. et al., PLoS. One. **6** (2011)

Emaduddin, M. et al., Cell Commun. Signal. **6** (2008)

Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. **6** (2014)

Epelbaum, R. et al., Pathol. Oncol Res **4** (1998)

Fan, T. W. et al., Mol Cancer **8** (2009)

Fang, Z. Q. et al., Genet. Mol Res **12** (2013)

Fassas, A. B. et al., Leuk. Lymphoma **45** (2004)

Feferman, L. et al., Prostate Cancer Prostatic. Dis. **16** (2013)

Fei, F. et al., J Cancer Res Clin Oncol (2014a)

Fei, F. et al., Ann Surg. Oncol **21** (2014b)

Feigelson, H. S. et al., Breast Cancer Res **10** (2008)

Feng, L. et al., Cell Biochem. Funct. **29** (2011)

Feng, M. et al., J Clin Invest **124** (2014a)

Feng, S. et al., Int. J Biol. Sci. **9** (2013)

Feng, Y. et al., J Biol. Chem. **289** (2014b)

Feng, Y. et al., Free Radic. Res **46** (2012)

Fernandes, C. F. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **361** (2007)

Ferre, S. et al., J Am Soc Nephrol. **25** (2014)

Ferrer-Ferrer, M. et al., Arch. Med. Res **44** (2013)

Filmus, J. et al., FEBS J **280** (2013)

Fiorito, V. et al., Biochim. Biophys. Acta **1839** (2014)

Fojo, A. T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **84** (1987)

Fonseca, A. L. et al., Genes Chromosomes. Cancer **51** (2012)

Fossdal, G. et al., ScientificWorldJournal. **2012** (2012)

Fournier, T. et al., Biochim. Biophys. Acta **1482** (2000)

Fu, W. et al., J Cell Sci. **123** (2010)

Fujitomo, T. et al., Cancer Res **72** (2012)

Furukawa, T. et al., Sci. Rep. **1** (2011)

Furutani, M. et al., Hepatology **24** (1996)

Gadd, S. et al., Lab Invest **90** (2010)

Gailani, D. , Trends Cardiovasc. Med. **10** (2000)

Galamb, O. et al., Helicobacter. **13** (2008)

Galazis, N. et al., Gynecol. Endocrinol. **29** (2013)

Gandhi, A. V. et al., Ann Surg. Oncol **20 Suppl 3** (2013)

Gao, L. et al., Mol Oncol **6** (2012)

Garcia-Baquero, R. et al., Tumour. Biol. **35** (2014)

Gardner-Stephen, D. A. et al., Drug Metab Dispos. **35** (2007)

Garg, M. et al., Cancer **116** (2010a)

Garg, M. et al., Eur. J Cancer **46** (2010b)

Gburcik, V. et al., Mol Cell Biol. **25** (2005)

Gergely, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **97** (2000)

Gervasini, G. et al., Cancer **107** (2006)

Getty, A. L. et al., Cell Mol Life Sci. **68** (2011)

Gilabert, M. et al., J Cell Physiol **228** (2013)

Gilkes, D. M. et al., Mol Cancer Res **11** (2013)

Giovannetti, E. et al., J Natl. Cancer Inst. **106** (2014)

Gokmen-Polar, Y. et al., Mod. Pathol. (2014)

Goldstein, I. et al., Carcinogenesis **34** (2013)

Gong, Y. et al., Genet. Mol Res **12** (2013)

Goode, E. L. et al., Clin Cancer Res **16** (2010)

Gordon, E. M. et al., Am. J Pediatr. Hematol. Oncol **15** (1993)

Gotzmann, J. et al., Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr. **9** (1999)

Gray, L. R. et al., Cell Mol Life Sci. **71** (2014)

Gregory, P. A. et al., J Biol. Chem. **278** (2003)

Greif, P. A. et al., Leukemia **25** (2011)

Gu, W. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Guo, L. et al., Cancer Sci. **103** (2012)

Halon, A. et al., Arch. Gynecol. Obstet. **287** (2013)

Hamamoto, R. et al., Cancer Sci. **97** (2006)

Hamilton, S. R. et al., Glycobiology **15** (2005)

Hamm, A. et al., BMC. Cancer **8** (2008)

Hanioka, N. et al., Basic Clin Pharmacol. Toxicol. **110** (2012)

Harris, M. et al., Pharmacogenet. Genomics **24** (2014)

Hatakeyama, H. et al., Proteomics. **6** (2006)

Havens, M. A. et al., PLoS. Genet. **10** (2014)

He, P. et al., Hum. Pathol. **35** (2004)

He, X. et al., Neoplasma **61** (2014a)

He, Y. et al., Mol Carcinog. (2014b)

Hellwinkel, O. J. et al., Prostate Cancer Prostatic. Dis. **14** (2011)

Hemmingsson, O. et al., Oncol Rep. **22** (2009)

Hidalgo-Curtis, C. et al., Br. J Haematol. **148** (2010)

Hider, J. L. et al., BMC. Evol. Biol. **13** (2013)

Hinsch, N. et al., BMC. Cancer **9** (2009)

Hirota, Y. et al., Nucleic Acids Res **28** (2000)

Hlavata, I. et al., Mutagenesis **27** (2012)

Hoelz, D. J. et al., Proteomics. **6** (2006)

Holden, H. M. et al., Cell Mol Life Sci. **61** (2004)

Honda, K. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Hong, Y. et al., J Biol. Chem. **274** (1999)

Hood, F. E. et al., Bioarchitecture. **1** (2011)

Hood, F. E. et al., J Cell Biol. **202** (2013)

Hopfer, O. et al., Br. J Cancer **93** (2005)

Horani, A. et al., Am J Hum. Genet. **91** (2012)

Hou, M. et al., Int. J Mol Med. **33** (2014)

Hu, D. G. et al., Drug Metab Rev. **46** (2014)

Hua, D. et al., Int. J Mol Med. **30** (2012a)

Hua, T. et al., J Biol. Chem. **287** (2012b)

Huang, O. et al., Jpn. J Clin Oncol **43** (2013)

Huang, S. et al., Oncogene **21** (2002)

Huang, Y. et al., Oncotarget. **5** (2014)

Hughes, H. et al., J Cell Sci. **123** (2010)

Hunecke, D. et al., J Pathol. **228** (2012)

Huopaniemi, L. et al., Glycobiology **14** (2004)

Hyung, S. W. et al., Mol Cell Proteomics. **10** (2011)

Iannitti, T. et al., Mar. Drugs **8** (2010)

Ichida, K. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **282** (2001)

Ignatova, I. D. et al., Am J Physiol Endocrinol. Metab **296** (2009)

Ikeda, R. et al., Int. J Oncol **38** (2011)

Inuzuka, M. et al., J Biol. Chem. **280** (2005)

Ishiguro, H. et al., Oncogene **21** (2002)

Ishizaki, F. et al., Sci. Rep. **3** (2013)

Ivashchenko, A. T. et al., Biomed. Res Int. **2013** (2013)

Jacquemier, J. et al., Cancer Res **65** (2005)

Jacques, C. et al., Br. J Cancer **101** (2009)

Jaffe, E. K. et al., Arch. Biochem. Biophys. **530** (2013)

Jakobsson, A. et al., Prog. Lipid Res **45** (2006)

Jamroziak, K. et al., Eur. J Haematol. **72** (2004)

Jeung, H. C. et al., Oncologist. **12** (2007)

Jia, Y. et al., Br. J Cancer **110** (2014)

Jiang, J. G. et al., Cancer Res **65** (2005)

Jiang, X. et al., Histol. Histopathol. **25** (2010)

Jiang, X. et al., Mol Carcinog. (2014)

Jin, Z. et al., Int. J Clin Exp. Pathol. **7** (2014)

Jockusch, H. et al., Proteomics. **14** (2014)

Johnson, M. A. et al., Ann N. Y. Acad. Sci. **1012** (2004)

Jose-Eneriz, E. S. et al., Br. J Haematol. **142** (2008)

Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987)

Jung, H. J. et al., J Mol Med. (Berl) **91** (2013)

Kaira, K. et al., Hepatobiliary. Pancreat. Dis. Int. **13** (2014)

Kalsotra, A. et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. **199** (2004)

Kalthoff, S. et al., J Biol. Chem. **285** (2010)

Kamiyama, S. et al., Glycobiology **21** (2011)

Kamiyama, S. et al., J Biol. Chem. **281** (2006)

Kandil, D. H. et al., Adv. Anat. Pathol. **16** (2009)

Kandimalla, R. et al., Nat Rev. Urol. **10** (2013)

Karvonen, U. et al., J Mol Biol. **382** (2008)

Kelleher, D. J. et al., Glycobiology **16** (2006)

Khan, A. P. et al., Neoplasia. **15** (2013)

Kim, Y. et al., Hum. Pathol. **46** (2015)

Kim, Y. W. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Klein, C. J. et al., Neurology **82** (2014)

Kobayashi, T. et al., Biochem. J **400** (2006)

Kollmann, K. et al., Cancer Cell **24** (2013)

Komatsu, M. et al., Pharmacol. Res **66** (2012)

Kong, S. Y. et al., Cancer Sci. **99** (2008)

Kovacevic, Z. et al., Biochim. Biophys. Acta **1783** (2008)

Kracmarova, A. et al., Leuk. Lymphoma **49** (2008)

Kraemer, N. et al., Cell Mol Life Sci. **68** (2011)

Kress, T. R. et al., Mol Cell **41** (2011)

Krohn, A. et al., J Pathol. **231** (2013)

Krupenko, S. A. et al., Cell Growth Differ. **13** (2002)

Kubota, H. et al., Cell Stress. Chaperones. **15** (2010)

Kummel, D. et al., EMBO Rep. **6** (2005)

Kunutsor, S. K. et al., Int. J Cancer (2014)

Kuriyama, H. et al., Gene **253** (2000)

Laezza, F. et al., Mol Cell Neurosci. **34** (2007)

Lahiri, S. et al., PLoS. Biol. **12** (2014)

Lando, M. et al., J Pathol. **230** (2013)

Lapucci, A. et al., FASEB J **24** (2010)

Lascorz, J. et al., BMC. Med. Genet. **13** (2012)

Lauffart, B. et al., BMC. Womens Health **5** (2005)

Laverdiere, I. et al., Endocr. Relat Cancer (2014)

Leasure, C. D. et al., Plant Physiol **150** (2009)

Lee, C. H. et al., Hum. Reprod. **24** (2009)

Lee, K. W. et al., J Biol. Chem. **288** (2013)

Lee, S. J. et al., Toxicol. Lett. (2014)

Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005)

Lee, Y. C. et al., Int. J Cancer **122** (2008)

Lekva, T. et al., PLoS. One. **8** (2013)

LeRoy, P. J. et al., Cancer Res **67** (2007)

Leung, T. et al., Breast Cancer Res **15** (2013)

Levenson, V. V. et al., Somat. Cell Mol Genet. **25** (1999)

Levi, S. et al., Front Pharmacol. **5** (2014)

Li, D. et al., Protein Cell **5** (2014a)

Li, N. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **455** (2014)

Li, X. et al., Med. Oncol **31** (2014b)

Li, Y. et al., Mol Cell Biol. **29** (2009)

Li, Y. H. et al., World J Gastroenterol. **18** (2012)

Liang, J. et al., PLoS. One. **3** (2008)

Lillig, C. H. et al., Antioxid. Redox. Signal. **9** (2007)

Lin, C. H. et al., J Cell Biol. **189** (2010)

Lin, M. C. et al., Oral Oncol **50** (2014)

Lin, S. H. et al., Oncogene **23** (2004)

Lin, Z. et al., Cell Rep. **5** (2013)

Linderoth, J. et al., Br. J Haematol. **141** (2008)

Line, A. et al., Cancer Immunol Immunother. **51** (2002)

Ling, C. et al., EMBO J **26** (2007)

Linge, A. et al., J Proteome. Res **13** (2014)

Lioutas, A. et al., EMBO Rep. **14** (2013)

Liu, C. et al., Nat Med. **20** (2014)

Liu, C. et al., J Natl. Cancer Inst. **105** (2013a)

Liu, H. et al., Carcinogenesis **34** (2013b)

Liu, T. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **106** (2009a)

Liu, W. et al., J Biol. Chem. **279** (2004)

Liu, Y. et al., Curr. Drug Targets. **13** (2012)

Liu, Y. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **18** (2009b)

Liu, Y. et al., Oncol Rep. **18** (2007)

Ljungberg, B. , Curr. Opin. Urol. **17** (2007)

Llovet, J. M. et al., N. Engl. J Med. **359** (2008)

Lo Re, A. E. et al., J Biol. Chem. **287** (2012)

Lo, W. Y. et al., J Proteome. Res **6** (2007)

Lombardo, Y. et al., Breast Cancer Res **16** (2014)

Lourenco, G. J. et al., Breast Cancer Res Treat. **100** (2006)

Lovelace, L. L. et al., J Biol. Chem. **286** (2011)

Lung, H. L. et al., Int J Cancer **127** (2010)

Lutcke, H. , Eur. J Biochem. **228** (1995)

Ma, X. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **100** (2003)

Mackiewicz, A. et al., Glycoconj. J **12** (1995)

Mahajan, K. et al., Cancer Lett. **338** (2013)

Mamtani, M. et al., BMC. Res Notes **5** (2012)

Mariani, L. et al., Clin Cancer Res **7** (2001)

Marina, M. et al., Front Biosci. (Landmark. Ed) **19** (2014)

Markiewski, M. M. et al., Nat Immunol **9** (2008)

Martin, T. A. et al., Eur. J Cancer **40** (2004)

Martinez, H. D. et al., Genes Cancer **2** (2011)

Mathison, J. et al., Pathobiology **59** (1991)

Matsubara, J. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **20** (2011)

Matusiak, D. et al., J Histochem. Cytochem. **55** (2007)

McGuire, T. A. , Md Med. J **40** (1991)

Medjkane, S. et al., Cell Cycle **11** (2012)

Meijers, J. C. et al., Br. J Haematol. **108** (2000)

Mercer, C. A. et al., Autophagy. **5** (2009)

Mercurio, F. A. et al., Biochemistry **51** (2012)

Midorikawa, Y. et al., Jpn. J Cancer Res. **93** (2002)

Miled, C. et al., Cancer Res **65** (2005)

Milkereit, P. et al., J Biol. Chem. **278** (2003)

Miller, J. C. et al., Mol Carcinog. **48** (2009)

Mohelnikova-Duchonova, B. et al., Pancreas **42** (2013)

Monaco, M. E. et al., Transl. Oncol **3** (2010)

Morandi, F. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Morrissey, J. J. et al., Urology **83** (2014)

Mu, J. et al., J Biol. Chem. **272** (1997)

Murray, D. W. et al., Br. J Cancer **110** (2014)

Murray, J. I. et al., Mol Biol. Cell **15** (2004)

Murrin, L. C. et al., J Neuroimmune. Pharmacol. **2** (2007)

Murthy, K. G. et al., Genes Dev. **9** (1995)

Mydlikova, Z. et al., Neoplasma **57** (2010)

Narita, T. et al., Mol Cell Biol. **23** (2003)

Narjoz, C. et al., PLoS. One. **9** (2014)

Nelson, E. R. et al., Science **342** (2013)

Ngeow, J. et al., Cancer Discov. **4** (2014)

Nibbe, R. K. et al., Mol. Cell Proteomics. **8** (2009)

Nielsen, M. J. et al., Blood **108** (2006)

Noda, T. et al., Hepatology **55** (2012)

Noh, C. K. et al., Clin Biochem. **47** (2014)

Ntikoudi, E. et al., Cancer Treat. Rev. **40** (2014)

Nwosu, V. et al., Hum. Mol Genet. **10** (2001)

Obholz, K. L. et al., Dev. Biol. **298** (2006)

Oeffner, F. et al., Am J Hum. Genet. **84** (2009)

Ofman, R. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **281** (2001)

Ohshima, K. et al., Mol Biol. Evol. **27** (2010)

Oiso, S. et al., Oncol Rep. **31** (2014)

Oji, Y. et al., Int. J Oncol **44** (2014)

Osada, H. et al., Int. J Cancer **112** (2004)

Otero-Rey, E. M. et al., Oral Oncol **44** (2008)

Palmer, D. H. et al., Hepatology **49** (2009)

Panico, F. et al., Adv. Cancer Res **105** (2009)

Park, B. L. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **363** (2007)

Patel, M. R. et al., Laryngoscope **121** (2011)

Patel, S. A. et al., Br. J Cancer (2014)

Pattani, K. M. et al., PLoS. ONE. **7** (2012)

Pavelec, D. M. et al., Genetics **183** (2009)

Pawlowska, M. et al., Drug Metab Dispos. **41** (2013)

Pehlivan, D. et al., Eur. J Hum. Genet. **22** (2014)

Pei, Z. et al., PLoS. One. **8** (2013)

Pellanda, H. et al., Int. J Biochem. Cell Biol. **44** (2012)

Peng, R. et al., J Cell Biol. **157** (2002)

Perera, S. et al., J Muscle Res Cell Motil. **33** (2012)

Persaud-Sawin, D. A. et al., Hum. Mol Genet. **11** (2002)

Peters, D. G. et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **14** (2005)

Pizon, V. et al., J Cell Sci. **115** (2002)

Placke, T. et al., Blood **124** (2014)

Plebani, R. et al., Neoplasia. **14** (2012)

Poh, W. et al., Mol Cancer **11** (2012)

Porkka, K. P. et al., Genes Chromosomes. Cancer **39** (2004)

Pylypenko, O. et al., Mol Cell **11** (2003)

Qi, L. et al., Cancer Res **74** (2014)

Qin, Y. et al., Pigment Cell Melanoma Res **26** (2013)

Quayle, S. N. et al., Neuro Oncol **14** (2012)

Quek, H. H. et al., DNA Cell Biol. **16** (1997)

Quidville, V. et al., Cancer Res **73** (2013)

Rajadhyaksha, A. M. et al., Am. J Hum. Genet. **87** (2010)

Rajasekaran, A. K. et al., Nucleic Acids Res **23** (1995)

Rajendran, M. et al., Cancer Metastasis Rev. **29** (2010)

Rakheja, D. et al., Mol Genet. Metab **93** (2008)

Ramana, C. V. et al., EMBO J **19** (2000)

Rashad, N. M. et al., Cytokine **68** (2014)

Rath, N. et al., EMBO Rep. **13** (2012)

Recupero, D. et al., Rom. J Morphol. Embryol. **51** (2010)

Reinisch, W. et al., J Immunother. **25** (2002)

Rekdal, C. et al., J Biol. Chem. **275** (2000)

Ren, Y. G. et al., Mol Biol. Cell **15** (2004)

Rennoll, S. A. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **443** (2014)

Rifas, L. et al., Arthritis Rheum. **60** (2009)

Riihila, P. M. et al., J Invest Dermatol. **134** (2014)

Rodriguez, F. J. et al., J Neuropathol. Exp. Neurol. **67** (2008)

Rogov, V. et al., Mol Cell **53** (2014)

Romanuik, T. L. et al., BMC. Genomics **10** (2009)

Roodman, G. D. , Ann N. Y. Acad. Sci. **1192** (2010)

Rosado, I. V. et al., RNA. **10** (2004)

Rose, A. E. et al., Cancer Res **71** (2011)

Ross, H. et al., Arch. Pathol. Lab Med. **136** (2012)

Rossi, M. R. et al., Cancer Genet. Cytogenet. **161** (2005)

Rotondo, R. et al., Int. J Cancer **125** (2009)

Rucksaken, R. et al., Cancer Biomark. **12** (2012)

Ruiz, F. X. et al., Biochem. J **440** (2011)

Ruiz, F. X. et al., Front Pharmacol. **3** (2012)

Rutkowski, M. J. et al., Mol Cancer Res **8** (2010)

Rylova, S. N. et al., Cancer Res **62** (2002)

Sahm, F. et al., Cancer Res **73** (2013)

Sahu, A. et al., Immunol Res **17** (1998)

Saito, T. et al., J Biol. Chem. **278** (2003)

Salahshor, S. et al., J Clin Pathol. **58** (2005)

Sang, W. et al., Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi. **42** (2013)

Sangro, B. et al., J Clin Oncol **22** (2004)

Sanz, L. et al., Mol Cell Biol. **15** (1995)

Saponaro, C. et al., Cancer Biomark. **14** (2014)

Sarajlic, A. et al., Breast Cancer Res Treat. **143** (2014)

Sasahira, T. et al., Eur. J Cancer **50** (2014)

Schneider, E. et al., Clin Chim. Acta **374** (2006)

Schofield, A. V. et al., Crit Rev. Biochem. Mol Biol. **48** (2013)

Schulz, E. G. et al., Immunity. **30** (2009)

Seifert, M. et al., J Pathol. **205** (2005)

Senchenko, V. et al., Oncogene **22** (2003)

Shaughnessy, J. D. , Jr. et al., Blood **118** (2011)

Shen, F. et al., J Cell Biochem. **112** (2011)

Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004a)

Shi, Y. et al., Exp. Cell Res **296** (2004b)

Shi, Z. Z. et al., Clin Transl. Oncol **16** (2014)

Shinji, S. et al., Oncol Rep. **15** (2006)

Shodeinde, A. et al., J Mol Biochem. **2** (2013)

Shubbar, E. et al., BMC. Cancer **13** (2013)

Shurbaji, M. S. et al., Am J Clin Pathol. **96** (1991)

Sillars-Hardebol, A. H. et al., Gut **61** (2012)

Singh, S. et al., Tumour. Biol. (2014)

Smith, P. et al., Clin Cancer Res **13** (2007)

Song, C. et al., J Biol. Chem. **288** (2013)

Srivenugopal, K. S. et al., Cancer Lett. **117** (1997)

Staal-van den Brekel AJ et al., Br. J Cancer **76** (1997)

Steen, H. C. et al., J Interferon Cytokine Res. **32** (2012)

Stefanska, B. et al., Clin Cancer Res **20** (2014)

Strassburg, C. P. et al., J Biol. Chem. **273** (1998)

Strassburg, C. P. et al., Mol Pharmacol. **52** (1997)

Sudo, H. et al., Genomics **95** (2010)

Sugihara, T. et al., J Biol. Chem. **276** (2001)

Sun, C. et al., Pathol. Res Pract. **210** (2014)

Sun, X. et al., J Pathol. **226** (2012)

Sun, X. et al., Protein Cell **4** (2013)

Sun, X. J. et al., Zhonghua Yi. Xue. Yi. Chuan Xue. Za Zhi. **22** (2005)

Supernat, A. et al., Oncol Lett. **4** (2012)

Surmacz, E. , J Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. **18** (2013)

Suzuki, K. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **368** (2008)

Swallow, C. J. et al., Oncogene **24** (2005)

Tabuchi, K. et al., J Neurosci. **22** (2002)

Taguchi, O. et al., Clin Chim. Acta **244** (1996)

Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991)

Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000)

Takeda, Y. et al., Glycobiology **24** (2014)

Takemasa, I. et al., Int. J Oncol **40** (2012)

Takeuchi, A. et al., Mol Cell Endocrinol. **384** (2014)

Tan, L. Z. et al., Am J Pathol. **183** (2013)

Tan, M. K. et al., Mol Cell Biol. **31** (2011)

Tanahashi, N. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **243** (1998)

Tanaka, M. et al., Mol Med. Rep. **7** (2013)

Tang, L. et al., Arch. Med. Res **43** (2012)

Tang, X. H. et al., Annu. Rev. Pathol. **6** (2011)

Tao, J. et al., Sci. Transl. Med. **3** (2011)

Tao, R. H. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. **341** (2006)

Tao, T. et al., Cell Res **23** (2013)

Tarao, K. et al., Cancer **86** (1999)

Tarao, K. et al., Cancer **79** (1997)

Tasker, P. N. et al., Osteoporos. Int. **17** (2006)

Telikicherla, D. et al., Clin Proteomics. **9** (2012)

Tian, T. et al., Eur. J Cancer **48** (2012)

Tian, Y. et al., BMC. Cancer **14** (2014)

Tomiyama, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **107** (2010)

Tomoda, T. et al., J Gastroenterol. Hepatol. **27** (2012)

Tong, J. et al., PLoS. One. **8** (2013)

Tortorella, S. et al., J Membr. Biol. **247** (2014)

Tran, E. et al., Science **344** (2014)

Trougakos, I. P. , Gerontology **59** (2013)

Tsai, H. Y. et al., Oncogene **32** (2013)

Uddin, S. et al., Int. J Clin Exp. Pathol. **4** (2011)

Uehara, Y. et al., Cancer Res **43** (1983)

Urig, S. et al., Semin. Cancer Biol. **16** (2006)

Vainio, P. et al., Am. J Pathol. **178** (2011)

van der Spek, P. J. et al., Genomics **31** (1996)

van Zuylen, W. J. et al., PLoS. Pathog. **8** (2012)

van, den Broek, I et al., Proteomics. Clin Appl. **4** (2010)

van, Duin M. et al., Haematologica **96** (2011)

Vejda, S. et al., Mol Cell Proteomics. **1** (2002)

Vincent, F. et al., Cancer Res **69** (2009)

Wang, B. S. et al., Cell Stress. Chaperones. **18** (2013a)

Wang, D. et al., J Biol. Chem. **277** (2002)

Wang, J. et al., Eur. J Cancer Prev. **22** (2013b)

Wang, J. et al., J Clin Invest **112** (2003)

Wang, J. et al., Cancer Prev. Res (Phila) **6** (2013c)

Wang, J. C. et al., Oncology **81** (2011)

Wang, M. et al., Chin J Physiol **55** (2012)

Wang, S. K. et al., PLoS. Genet. **9** (2013d)

Wang, S. S. et al., PLoS. One. **5** (2010)

Wang, X. et al., Urol. Int. **92** (2014)

Wang, Y. et al., J Biol. Chem. **274** (1999)

Wang, Y. et al., Med. Oncol **32** (2015)

Wazir, U. et al., Cell Mol Biol. Lett. **18** (2013)

Wazir, U. et al., Anticancer Res **32** (2012)

Weiss, J. et al., Int. J Antimicrob. Agents **41** (2013)

Welsh, M. M. et al., Carcinogenesis **29** (2008)

Wieser, R. , Leuk. Lymphoma **43** (2002)

Wilhelm, S. M. et al., Cancer Res. **64** (2004)

Williams, A. L. et al., Nature **506** (2014)

Witte, I. et al., Cell Death. Dis. **2** (2011)

Wong, K. K. et al., Leukemia **28** (2014)

Wong, N. et al., J Hepatol. **38** (2003)

Wu, L. et al., Ann Hematol. **91** (2012)

Wu, N. et al., Int. J Mol Sci. **14** (2013a)

Wu, W. et al., Sci. China Life Sci. **56** (2013b)

Wu, X. et al., Am. J Clin Exp. Urol. **2** (2014)

Wu, Y. M. et al., Cancer Res **71** (2011)

Xiao, J. et al., J Biol. Chem. **276** (2001)

Xie, F. W. et al., Neoplasma **61** (2014)

Xu, H. et al., Cell Rep. **9** (2014)

Xu, X. et al., Proteomics. **10** (2010)

Yan, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **98** (2001)

Yang, C. et al., Virchows Arch. **463** (2013)

Yang, C. Y. et al., J Immunol **192** (2014a)

Yang, H. et al., Oncol Rep. **24** (2010)

Yang, H. W. et al., Oncogene **0** (2014b)

Yang, R. et al., Mol Cell Biol. **31** (2011a)

Yang, Z. J. et al., Mol Cancer Ther **10** (2011b)

Yau, C. et al., Breast Cancer Res **12** (2010)

Ye, X. H. et al., Mol Genet. Genomics (2014)

Yoon, J. K. et al., J Transl. Med. **12** (2014)

Yoshimura, S. et al., J Cell Biol. **191** (2010)

Yoshizuka, N. et al., Mol Cancer Res **10** (2012)

Yosten, G. L. et al., Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol **303** (2012)

Yu, J. H. et al., RNA. **11** (2005)

Yu, K. et al., PLoS. Genet. **4** (2008)

Yue, C. et al., Int. J Cancer **136** (2015)

Zamanian-Daryoush, M. et al., J Biol. Chem. **288** (2013)

Zarling, A. L. et al., Cancer Res **74** (2014)

Zekri, A. R. et al., Asian Pac. J Cancer Prev. **13** (2012)

Zelcer, N. et al., Mol Cell Biol. **34** (2014)

Zhang, D. et al., Pak. J Med. Sci. **29** (2013a)

Zhang, H. et al., Oncotarget. **4** (2013b)

Zhang, H. T. et al., Biochim. Biophys. Acta **1839** (2014a)

Zhang, J. et al., Drug Metab Dispos. **34** (2006)

Zhang, S. et al., BMC. Cancer **11** (2011)

Zhang, X. et al., PLoS. One. **7** (2012)

Zhang, X. D. et al., Int. J Clin Exp. Med. **7** (2014b)

Zhao, Y. et al., Cell Death. Dis. **4** (2013)

Zhou, B. et al., Cancer Biol. Ther **13** (2012)

Zhou, D. et al., PLoS. One. **8** (2013a)

Zhou, J. et al., Oncol Rep. **30** (2013b)

Zhou, J. et al., Lung Cancer **14** (1996)

Zhu, H. et al., Cell Stress. Chaperones. (2014a)

Zhu, W. L. et al., Anticancer Res **29** (2009)

Zhu, X. et al., Biomed. Pharmacother. **68** (2014b)

Zhuang, Z. et al., J Neurosurg. **115** (2011)

Zietek, Z. et al., Pol. Tyg. Lek. **51** (1996)

Zou, W. et al., Cancer Sci. **101** (2010)

Zu, X. et al., Molecules. **18** (2013)

Zu, X. Y. et al., Recent Pat Anticancer Drug Discov. **7** (2012)

Zynda, E. R. et al., Cell Cycle **13** (2014)