I32944WO-A

Péptidos, combinaciones de péptidos y células para inmunoterapia contra el cáncer de vejiga urinaria 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 como tales, también pueden ser dianas de anticuerpos, de receptores de linfocitos T solubles, y de otras moléculas de unión.

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El tipo más frecuente de cáncer vesical comienza en el urotelio o epitelio de transición, la capa más interna de la vejiga urinaria, por lo que se denomina carcinoma urotelial o carcinoma de células transicionales (CCT). Las células uroteliales radican en otras partes de las vías urinarias, que en los pacientes con cáncer vesical también pueden resultar infiltradas por el tumor. El cáncer de vejiga en progresión va creciendo por las demás

capas de la pared vesical o bien las atraviesa y se extiende primero a los ganglios linfáticos, los huesos, los pulmones o el hígado (American Cancer Society, 2015).

El cáncer vesical se clasifica en función de su diseminación y del tipo de crecimiento. Según su diseminación se clasifica como no invasivo o invasivo. El cáncer vesical superficial o no invasivo está localizado exclusivamente en la capa más interna de la pared vesical. En cambio, el cáncer vesical invasivo se infiltra hasta las capas profundas de la pared vesical (American Cancer Society, 2015).

Dependiendo del tipo de crecimiento, el cáncer vesical se divide en carcinoma papilar y plano. El carcinoma papilar crece en forma de finas prolongaciones dactiliformes desde el lado interno del tumor hacia el centro hueco. Los carcinomas papilares a menudo no son invasivos. El cáncer papilar no invasivo de crecimiento sumamente lento se subdivide a su vez en neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno (NUPBPM). Tales tumores suelen mostrar un excelente desenlace terapéutico en la mayoría de casos. Los carcinomas planos no crecen hacia el centro del tumor vesical. Los carcinomas vesicales planos que están circunscritos exclusivamente a la capa interna de la pared vesical reciben el nombre de carcinoma plano no invasivo o carcinoma plano *in situ* (CIS). Tanto los carcinomas papilares como planos que se infiltran en las capas profundas de la pared vesical se denominan carcinoma urotelial invasivo o de células transicionales (American Cancer Society, 2015).

Los otros tipos de cáncer que se gestan en la vejiga son el carcinoma epidermoide y microcítico, el adenocarcinoma y el sarcoma. Tales tipos de cáncer son poco frecuentes (American Cancer Society, 2015). El cáncer vesical se divide en 5 estadios. En el estadio 0, las células cancerosas se limitan exclusivamente a la capa más interna de la pared vesical. El cáncer vesical en estadio 0 se divide en estadio 0a si el carcinoma es papilar o en estadio 0 si el carcinoma es plano. En los subsiguientes estadios I y II, las células cancerosas vesicales se infiltran en más capas de la pared vesical y se diseminan hasta el tejido conectivo y el tejido muscular, respectivamente. En el estadio III, las células cancerosas vesicales prosiguen su diseminación desde la vejiga hasta la grasa

circundante o incluso los órganos reproductores. En el estadio IV, el cáncer vesical infiltra la pared del abdomen o la pelvis, los ganglios linfáticos y otros órganos distantes como el pulmón, los huesos o el hígado (National Cancer Institute, 2015).

En Estados Unidos, el cáncer de vejiga urinaria supone la novena causa de muerte por cáncer. El porcentaje de muertes causadas por el cáncer vesical aumenta con la edad y alcanza su máximo entre los 75 y los 84 años. El cáncer vesical supone hasta el 4,5% de todos los casos nuevos de cáncer. El cáncer vesical se diagnostica con mayor frecuencia en las personas de 65 a 84 años. Y se diagnostica con una frecuencia casi 4 veces mayor en los varones que en las mujeres. Durante los últimos 10 años el número de casos nuevos de cáncer vesical ha descendido a razón de un 0,6% cada año, pero los índices de mortalidad y la supervivencia relativa a los 5 años permanecen estables (SEER Stat facts, 2014).

En promedio, la supervivencia relativa a los 5 años ante el cáncer vesical ronda el 77%. En general, la supervivencia relativa a los 5 años depende decisivamente del estadio en que se halla el cáncer cuando se diagnostica. El 51% de los casos nuevos de cáncer vesical se detectan en el estadio muy inicial *in situ*, cuando el tumor afecta únicamente a la capa originaria de la pared vesical. En ese estadio, la supervivencia relativa a los 5 años ronda el 96%. El 35% de los casos nuevos de cáncer vesical se diagnostican en el estadio localizado. En tales casos, el cáncer vesical queda limitado al foco primario y la supervivencia relativa a los 5 años ronda el 70%. La supervivencia relativa a los 5 años de los casos nuevos de cáncer de vejiga que se diagnostican en el estadio regional (cáncer diseminado a los ganglios linfáticos, 7% del total de casos nuevos) y en el estadio de diseminación a distancia (cáncer metastásico, 4% del total de casos nuevos) es del 34% y del 5,4%, respectivamente. Se desconoce el estadio del 3% restante de los casos de cáncer de vejiga diagnosticados *de novo*. La supervivencia relativa a los 5 años en tales casos ronda el 47% (SEER Stat facts, 2014).

El tratamiento estándar contra el cáncer de vejiga urinaria incluye la cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.

Como tratamiento del cáncer vesical se pueden practicar los siguientes tipos de intervenciones quirúrgicas: Resección transuretral, cistectomía parcial o radical y derivación urinaria. En la resección transuretral el tumor se extirpa de la pared interna de la vejiga por medios mecánicos o se fulgura (quema) con electricidad de alto voltaje. En la cistectomía se extirpa parcial o enteramente la vejiga junto con cualquier ganglio linfático y otras estructuras que hayan sido invadidas por el tumor en los órganos aledaños. La desviación urinaria es un tipo de intervención en que se construyen de nuevo un depósito y conductos de circulación para la orina. La cirugía se complementa a menudo con la aplicación de quimioterapia, con el propósito de reducir el riesgo de recidiva tumoral (National Cancer Institute, 2015).

En los estadios 0 y I, el cáncer vesical se suele tratar normalmente con resección transuretral, a veces seguida de quimioterapia intravesical y combinada opcionalmente con inmunoterapia intravesical con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG). La cistectomía parcial o radical es posible. El cáncer vesical en estadio II y III se trata con cistectomía parcial o radical, resección transuretral o radioterapia externa con o sin quimioterapia. En el estadio IV, el tratamiento depende del alcance de la diseminación de las células cancerosas por el cuerpo. Si las células cancerosas vesicales siguen radicadas exclusivamente en la vejiga, el tumor se puede tratar con quimioterapia sola, cistectomía radical o radioterapia externa que puede ir acompañada de quimioterapia. Si el cáncer ya ha invadido otras partes del cuerpo, la primera opción de tratamiento consiste en quimioterapia, acompañada en algunos casos de cirugía o radioterapia. En este estadio se pueden aplicar como tratamientos paliativos la radioterapia externa, la desviación urinaria o la cistectomía. En todos los estadios del cáncer vesical, los pacientes tienen la posibilidad de participar en un ensayo clínico (National Cancer Institute, 2015).

Hay establecido un abordaje inmunoterapéutico eficaz para el tratamiento del cáncer vesical agresivo sin invasión muscular (NMIBC, por sus siglas en inglés). Consiste en la administración en solución intravesical de una forma atenuada de la bacteria *Mycobacterium bovis* (bacilo de Calmette-Guérin, BCG). El principal efecto del

tratamiento con BCG es la notable protección a largo plazo (hasta 10 años) frente a la recidiva tumoral, así como la ralentización de la progresión. En principio, el tratamiento con el BCG desata una respuesta inflamatoria local que estimula la respuesta inmunitaria celular. La respuesta inmunitaria al BCG se basa en los siguientes puntos clave: infección de las células cancerosas vesicales y uroteliales por el BCG, seguida del aumento de la expresión de las moléculas presentadoras de antígeno, inducción de la respuesta inmunitaria mediada a través de la liberación de citocinas, estimulación de la actividad antitumoral por la intervención de diversas células inmunitarias (linfocitos T citotóxicos, neutrófilos, células NK y macrófagos) (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013).

El tratamiento con el BCG resulta en general bien tolerado por los pacientes, pero a veces puede tener consecuencias mortales, sobre todo en los pacientes inmunodeprimidos. En cerca del 30% al 40% de los pacientes se observa refractariedad al BCG (Fuge et al., 2015; Steinberg et al., 2016a). El tratamiento de los que fracasan con el BCG es difícil. Este tipo de pacientes tiene un alto riesgo de sufrir invasión muscular por la enfermedad. La cistectomía radical es la opción de tratamiento preferible para los no respondedores (Steinberg et al., 2016b; von Rundstedt and Lerner, 2015). La FDA aprobó un tratamiento de segunda línea contra el NMIBC con fracaso del BCG para aquellos pacientes que desean conservar la vejiga; está basado en la quimioterapia con valrubicina. Actualmente existen otros tratamientos de segunda línea disponibles o en fase de investigación, como por ejemplo, abordajes inmunoterapéuticos basados en el interferón combinado con el BCG o tratamientos con inhibidores de puntos de control junto con el BCG, vacunación transdérmica pre-BCG, tratamiento con ácido-nucleico-pared celular de *Mycobacterium phlei* (MCNA), quimioterapia compleja, en monoterapia o combinada con diversos agentes como mitomicina C, gemcitabina, docetaxel, nab-paclitaxel, epirrubicina, mitomicina/gemcitabina, gemcitabina/docetaxel, y quimioterapias asistidas por dispositivo como termoquimioterapia, quimiorradioterapia, terapias electromotriz o fotodinámica (Fuge et al., 2015; Steinberg et al., 2016b; von Rundstedt and Lerner, 2015). Es preciso proseguir la evaluación de los tratamientos disponibles en ensayos clínicos.

En general, el tratamiento del cáncer de vejiga avanzado con invasión muscular (CVIM), denominado carcinoma vesical mioinvasivo o cáncer vesical metastásico, es difícil y ha permanecido sustancialmente sin cambios en las últimas décadas. A día de hoy las opciones de tratamiento disponibles para el cáncer vesical en progresión no son eficaces. Las nuevas tendencias en el manejo clínico del cáncer vesical se han ampliado con los últimos conocimientos adquiridos acerca del trasfondo genético del cáncer urotelial. En especial, la reciente implementación de los biomarcadores predictivos de carácter molecular y genómico pretende mejorar la respuesta al tratamiento.

Hasta 2003, la cistectomía era el tratamiento estándar contra el cáncer de vejiga avanzado con invasión muscular. La recidiva tumoral a puntos distantes del cuerpo tras la cirugía puso de manifiesto la necesidad de tratamiento quimioterapéutico neoadyuvante. La quimioterapia combinada con dosis elevadas de metotrexato, vinblastina, doxorrubicina y cisplatino (MVAC acelerada o AMVAC) o gemcitabina y cisplatino (GC) constituye actualmente el tratamiento neoadyuvante estándar del CVIM en Estados Unidos. La aplicación adyuvante de la quimioterapia como tratamiento del CVIM se ve limitada por el alto índice de complicaciones quirúrgicas que conlleva la cistectomía radical. No obstante, actualmente se recomienda el uso de la quimioterapia AMVAC, GC o la combinación de cisplatino, metotrexato y vinblastina (CMV) como quimioterapia adyuvante para los pacientes con CVIM de alto riesgo. Para el tratamiento del cáncer vesical metastásico se usa una quimioterapia sistemática similar. En general, solo del 30% al 40% de los pacientes responden a la quimioterapia con cisplatino. Además, los pacientes con insuficiencia renal no son aptos para recibir el cisplatino. La segunda línea de tratamiento depende del tratamiento precedente y no ha sido estandarizada (Knollman et al., 2015b; Rouanne et al., 2016).

En este momento se están investigando en ensayos clínicos otras opciones alternativas para el tratamiento del cáncer vesical avanzado. Los ensayos clínicos en curso están centrados en el desarrollo de terapias moleculares dirigidas y en inmunoterapias. Las terapias dirigidas investigan los efectos de los inhibidores de la vía relacionada con la oncogenia (mTOR, receptores de factores de crecimiento epidérmico, fibroblástico, o del

endotelio vascular, anti-angiogénicos o inhibidores del ciclo celular) en el tratamiento del cáncer vesical. El desarrollo de las terapias moleculares dirigidas sigue siendo difícil a causa del alto grado de diversidad genética del cáncer vesical. El principal foco de la inmunoterapia actual consiste en el desarrollo de agentes que bloqueen los puntos de control, como el anticuerpo monoclonal anti-PD1 y la transferencia adoptiva de linfocitos T (Knollman et al., 2015b; Grivas et al., 2015; Jones et al., 2016; Rouanne et al., 2016).

A la vista de los graves efectos secundarios y del coste que comporta el tratamiento del cáncer, existe la necesidad de descubrir factores que puedan ser usados para el tratamiento del cáncer en general y, en particular, del cáncer de vejiga urinaria. Existe asimismo la necesidad de descubrir factores que puedan servir como biomarcadores del cáncer en general y del cáncer de vejiga urinaria en particular, con vistas a mejorar el diagnóstico, la valoración del pronóstico y la predicción del éxito terapéutico.

La inmunoterapia antitumoral representa una opción de tratamiento dirigido contra la células cancerosas que reduce los efectos secundarios. La inmunoterapia antitumoral aprovecha la existencia de los antígenos asociados a tumores. La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores (TAA) comprende los siguientes grupos principales:
a) Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase, que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatocitos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y, por tanto, se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.
b) Antígenos de diferenciación: Estos TAA son compartidos por los tumores y por el tejido normal del que deriva el tumor. La mayoría de los antígenos de diferenciación conocidos se halla en los melanomas y en los melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no

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

c) TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente distintos y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los 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, tal y 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.

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

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

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

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

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

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

Los péptidos alargados (más largos) de la invención pueden funcionar como epítopos activos para las MHC de clase II.

Los linfocitos T cooperadores, activados por epítopos de MHC de clase II, desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo TH1 apoyan las

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

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

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

Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los linfocitos T CD8+ (ligando: moléculas de MHC de clase I + 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.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos 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 dirigir la acción contra complejos péptido-MHC a través de TCR específicos (p. ej., TCR solubles) y de los anticuerpos u otras moléculas de unión (soportes) conformes a la invención, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En tales casos, la presentación es el factor determinante.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto de la presente invención, ésta se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 64 o a una secuencia

variante de la misma que es homóloga al menos en un 77%, preferiblemente al menos un 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 77% o al menos en un 88%) a la SEQ ID N.º 64, en que dicha variante se une a MHC y/o estimula linfocitos T que presentan reactividad cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido el polipéptido entero del que derivaría.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de la presente invención que comprende una secuencia de la SEQ ID N.º 64 o una variante de la misma, que es homóloga al menos en un 77%, preferiblemente al menos en un 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 77% o al menos en un 88%) a la SEQ ID N.º 64, en que dicho péptido o una variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente de entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

La presente invención se refiere preferiblemente a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 64, y los usos del mismo. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID N.º 2 a la SEQ ID N.º 3, de la SEQ ID N.º 5 a la SEQ ID N.º 63, de la SEQ ID N.º 65 a la SEQ ID N.° 118 o de la SEQ ID N.º 120 a la SEQ ID N.º 149 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 y la Tabla 2 se unen a los alelos HLA-A*02. Los péptidos de la Tabla 2 han sido dados a conocer con anterioridad, pero no habían sido vinculados en absoluto con el cáncer hasta ahora. Los péptidos de la Tabla 3 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos de la invención. Los péptidos de la Tabla 4 son además útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de otros tipos de neoplasias malignas en las que interviene una sobreexpresión o una presentación en exceso del respectivo polipéptido originario.

Tabla 1: Péptidos conformes a la presente invención. J = fosfoserina, U = fosfotreonina

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
2	GLLKAYSIRTA	3855	KRT7
3	YLDEIPPKFSM	4070	TACSTD2
5	IQDPVIFYV	57211	GPR126
6	SIVDFLITA	10848	PPP1R13L
7	QMFEGQILDV	55057	AIM1L
8	ALSFSSSAGPGLLKA	3855	KRT7
9	SLVDARFQL	130497	OSR1
10	GLWHGMFANV	57609	DIP2B
11	AMAELRVVV	126410	CYP4F22
12	GVALTVTGV	2319	FLOT2
13	FLEEKEQAAL	10626, 147166, 374286	TRIM16, CDRT1, TRIM16L
14	GLAGPVRGV	6628, 6638, 8926	SNURF, SNRPB, SNRPN
15	YLAPENGYLMEA	6625	SNRNP70
16	ILGPQGNTI	10657	KHDRBS1
17	RLSQLEGVNV	55737	VPS35
18	SIAAYNPVV	10202	DHRS2
19	SLATTLTKI	1315	COPB1
20	YLPDSLTQL	55227	LRRC1
21	TLIEDDALNGA	3248	HPGD
22	SIAKEGVVGA	6623	SNCG
23	YTLSKTEFL	6282	S100A11
24	SLLGGITVV	9043	SPAG9
25	SLDSSGFSL	143	PARP4
26	GLALLYSGV	533	ATP6V0B
27	STTNGGILTV	84248	FYTTD1
28	GLIDSLMAYV	5317	PKP1
29	ALSSPPPTV	9372	ZFYVE9
30	ILDISRSEV	57720	GPR107
31	SLFDGIATGL	1788	DNMT3A
32	YQAPDIDVQL	29997	GLTSCR2
33	VLFGEITRL	4720	NDUFS2
34	ALLDEQQVNV	3397	ID1
35	KLPEPPPLA	2086	ERV3-1
36	ALWDEFNQL	6899	TBX1
37	ILSAILVHL	339766	MROH2A
38	TLTSIIVAV	339766	MROH2A
39	AMASHLTST	100526737, 10432, 5936	RBM4
40	VIADRVVTV	127731	VWA5B1

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
41	FLDDGNQMLL	79659	DYNC2H1
42	FLIDASQRV	256076	COL6A5
43	FLIESKLLSL	92749	DRC1
44	GLAQDPKSLQL	23331	TTC28
45	IIDSSPTAL	79915	ATAD5
46	SLFIGAEIVAV	405753	DUOXA2
47	VLMDDTDPL	5700	PSMC1
48	VLMDDTDPLV	5700	PSMC1
49	SLIGGTNFV	162	AP1B1
50	VLANRVAVV	10202	DHRS2
51	ALLDKAQINL	147711, 26974	ZNF285
52	SLATLEGIQL	7776	ZNF236
53	ILVQVIPVV	3664	IRF6
54	ALNDEINFL	3855	KRT7
55	KLLETKWTL	3855	KRT7
56	ILLRDLPTL	400451	FAM174B
57	GLAHFVNEI	7750	ZMYM2
58	GLDSSVNVQGSVL	9589	WTAP
59	WLSTSIPEA	2194	FASN
60	SLSDVRVIV	57186	RALGAPA2
61	VLLDNLPGV	27152	INTU
62	GQLDFSEFL	6282	S100A11
63	LLAGLLVGV	54991	C1orf159
64	GLLSQGSPL	2729	GCLC
65	IITDLLRSV	8880	FUBP1
66	SLWEENQAL	3911	LAMA5
67	FLTPPLLSV	160	AP2A1
68	TMIVSLAAV	23204	ARL6IP1
69	QIWDKILSV	10202	DHRS2
70	KLAEISLGV	1830	DSG3
71	LLSEDFVSV	64847	SPATA20
72	SLFTGLRSI	50506, 53905	DUOX2, DUOX1
73	VLKVFLENV	121504, 554313, 8294, 8359, 8360, 8361, 8362, 8363, 8364, 8365, 8366, 8367, 8368, 8370	HIST1H4D, HIST1H4J, HIST2H4B, HIST1H4L, HIST1H4H, HIST1H4K, HIST1H4A, HIST2H4A, HIST1H4B, HIST1H4I, HIST4H4, HIST1H4E, HIST1H4C, HIST1H4F
74	LLQEGEVYSA	10594	PRPF8

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
75	RVISSVISV	64123	ELTD1
76	AVVSSVNTV	6623	SNCG
77	KVFGGFQVV	3280	HES1
78	FIPDFAVAI	1293	COL6A3
79	FLDPATPRV	7050	TGIF1
80	ILLDTPLFLL	253190, 94009	SERHL2
81	SLDKGTLYI	79887	PLBD1
82	NLHNSYYSV	901	CCNG2
83	VILDKYYFL	56649	TMPRSS4
84	ALDPASISV	54165	DCUN1D1
85	HLLDSKVPSV	3691	ITGB4
86	FLIJLIISV	50835	TAS2R9
87	RLLELLQEA	150696	PROM2
88	ALASLENHV	51592	TRIM33
89	YLFPETEFI	6926	TBX3
90	GMTELYFQL	5591	PRKDC
91	NLDAATYQV	23443	SLC35A3
92	ALLDEQQVNVLL	3397	ID1
93	LLDLIQTKV	162, 163	AP2B1, AP1B1
94	ALADGVPVAL	91056	AP5B1
95	YLIGQHVTA	23014	FBXO21
96	KLTNGIWVL	162	AP1B1
97	TVGPGLLGV	7450	VWF
98	YLIGLDPENLAL	54677	CROT
99	ALIGDDVGL	55421	C17orf85
100	SLQSFIHGV	79905	TMC7
101	ILDEMRAQL	4940	OAS3
102	GLYEGLDWL	373, 375, 377, 378	ARF3, TRIM23, ARF1, ARF4
103	GLYSGEVLV	89891	WDR34
104	NAVVELVTV	10159	ATP6AP2
105	TLFPSKIGV	55233, 92597	MOB1A, MOB1B
106	ILLDTPLFL	253190, 94009	SERHL2
107	LULAKLEKV	51531	C9orf156
108	YLDPNQRDL	126231	ZNF573

Tabla 2: Péptidos adicionales conformes a la presente invención

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
109	RLIDDMVAQA	3417	IDH1

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
110	VLFNIDGQGNHV	2625	GATA3
111	LLDVTPKAV	9414	TJP2
112	YLDPSLNSL	55086	CXorf57
113	FVFEPPPGV	1778	DYNC1H1
114	IITKDLFQV	1778	DYNC1H1
115	SLLDFERSL	84343	HPS3
116	QLAWFDTDL	1499	CTNNB1
117	YMLDIFHEVL	3038	HAS3
118	RLLDFPTLLV	54627	MAP10
120	IIIPEIQKV	1434	CSE1L
121	QLQGYLRSV	6128	RPL6
122	ILEPSLYTV	22818	COPZ1
123	NLAGVYSEV	4733	DRG1
124	QIDGTLSTI	100307126, 128866, 55030, 92421	FBXO34, CHMP4C, CHMP4B, CHMP4BP1
125	VLDEGSASV	1844	DUSP2
126	SLLRVGWSV	221092, 26580	BSCL2, HNRNPUL2
127	KLNATNIEL	5686	PSMA5
128	KLWGQSIQL	54823	SWT1
129	YLEPKLTQV	23198	PSME4
130	TLTSKLYSL	29796	UQCR10
131	ILTSIQSLL	7319, 7320	UBE2A, UBE2B
132	YILEGEPGKV	6730	SRP68
133	GLDPLGYEIQL	57122	NUP107
134	IVAPGTFEV	3608	ILF2
135	FLLPLIIVL	3140	MR1
136	GLSEPIFQL	55669	MFN1
137	ALFPHLLQPVL	1434	CSE1L
138	YLTNEGIQYL	100529239, 6204	RPS10-NUDT3, RPS10
139	LLYPTEITV	3675	ITGA3
140	ALLDGRVQL	375790	AGRN
141	SMFGAGLTV	533	ATP6V0B
142	FLGENISNFL	8542	APOL1
143	TLVTGLASV	55669	MFN1
144	YLAGEAPTL	7407	VARS
145	ALYPGQLVQL	64333	ARHGAP9
146	YLARIQGFQV	27067	STAU2
147	QMLELITRL	23405	DICER1
148	TLGVIPESV	84196	USP48
149	VLLRVLILL	102	ADAM10

Tabla 3: Péptidos útiles para, por ejemplo, tratamientos personalizados contra el cáncer.

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
150	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
151	SLAEEKLQASV	2194	FASN
152	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
153	GLLDPNVKSIFV	79033	ERI3
154	ILNVDGLIGV	47	ACLY
155	VLSSGLTAA	1459	CSNK2A2
156	KLVEFDFLGA	10460	TACC3
157	KLLDTMVDTFL	100527963, 11243	PMF1-BGLAP, PMF1
158	ILADTFIGV	222223	KIAA1324L
159	SLIEDLILL	64754	SMYD3
160	SLLGGNIRL	2181	ACSL3
161	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11, DDX12P
162	TLLAAEFLKQV	100288772, 10574	CCT7P2, CCT7
163	LLLEEGGLVQV	7353	UFD1L
164	ALADLTGTVV	23385	NCSTN
165	RLPDIPLRQV	55656	INTS8
166	YLEPYLKEV	727947, 7381	UQCRB
167	SLWGGDVVL	157680	VPS13B
168	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
169	LLIDDEYKV	23065	EMC1
170	GLIEIISNA	23020	SNRNP200
171	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
172	LLYGHTVTV	347734	SLC35B2
173	FVFSFPVSV	1846	DUSP4
174	SLLEKELESV	1819	DRG2
175	FIQLITGV	477, 478	ATP1A2, ATP1A3
176	SMSGYDQVL	3187, 3188	HNRNPH1, HNRNPH2
177	NLLQVLEKV	144501	KRT80
178	ALNEEAGRLLL	27338	UBE2S
179	TLGQIWDV	1778	DYNC1H1
180	GVIAEILRGV	10528	NOP56
181	YLGEGPRMV	5704	PSMC4
182	YLAPFLRNV	23019	CNOT1
183	YVFPGVTRL	84221	SPATC1L
184	LMTKEISSV	5591	PRKDC
185	GLSNLGIKSI	122553	TRAPPC6B
186	VLYPHEPTAV	29980, 5523	DONSON, PPP2R3A

SEQ ID N.º	Secuencia	ID(s) del gen	Símbolo(s) oficial(es) del gen
187	KLGAVFNQV	23450	SF3B3
188	KLFNEFIQL	10885	WDR3
189	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
190	LLFPHPVNQV	8518	IKBKAP
191	VLFQEALWHV	2194	FASN
192	ALNPADITV	51497	TH1L
193	ALVQDLAKA	891	CCNB1
194	SLLSHQVLL	57221	KIAA1244
195	ATLNIIHSV	51542	VPS54
196	LLHEENFSV	6942	TCF20
197	LLLPDYYLV	27044	SND1
198	NLIEKSIYL	667	DST
199	ALANQKLYSV	23195	MDN1
200	YLNVQVKEL	10051	SMC4
201	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
202	TLITDGMRSV	29894	CPSF1
203	FLIPYAIML	11254	SLC6A14
204	GVYDGEEHSV	4113	MAGEB2
205	KIVDFSYSV	701	BUB1B

La presente invención, además, se refiere en general a los péptidos acordes con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, como por ejemplo, leucemia mielógena aguda (LMA), cáncer de mama, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (LLC), carcinoma colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (CHC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, carcinoma de pulmón microcítico, cáncer de vejiga urinaria y cáncer de útero.

Se prefiere especialmente el péptido –solo o en combinación– conforme con la presente invención de la SEQ ID N.º 64. Se prefiere más el péptido – solo o combinado – de la SEQ ID N.º 64, y sus usos en la inmunoterapia del cáncer de vejiga urinaria, leucemia mielógena aguda (LMA), cáncer de mama, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (LLC), carcinoma colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (CHC), carcinoma de células de

Merkel, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico y cáncer de útero, pero preferiblemente cáncer de vejiga urinaria .

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

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

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
2	GLLKAYSIRTA	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de útero
3	YLDEIPPKFSM	Cáncer de próstata, cáncer de útero
5	IQDPVIFYV	Linfoma no hogdkiniano, cáncer de útero
6	SIVDFLITA	Cáncer de útero, cáncer escamoso de cabeza y cuello
7	QMFEGQILDV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
9	SLVDARFQL	Cáncer de próstata

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
10	GLWHGMFANV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, leucemia mielógena aguda, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, Cáncer escamoso de cabeza y cuello
11	AMAELRVVV	Carcinoma hepatocelular, cancer de mama, cáncer escamoso de cabeza y cuello
12	GVALTVTGV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de células renales, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, linfoma no hogdkiniano
13	FLEEKEQAAL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer escamoso de cabeza y cuello
14	GLAGPVRGV	Leucemia mielógena aguda, melanoma, carcinoma hepatocelular
15	YLAPENGYLMEA	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de útero, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer escamoso de cabeza y cuello
16	ILGPQGNTI	Leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, Melanoma, cáncer de útero
17	RLSQLEGVNV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, carcinoma hepatocelular, Melanoma, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer escamoso de cabeza y cuello
18	SIAAYNPVV	Cáncer de páncreas, linfoma no hogdkiniano
20	YLPDSLTQL	Melanoma, cáncer de útero, carcinoma hepatocelular
21	TLIEDDALNGA	Melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
23	YTLSKTEFL	Melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, linfoma no hogdkiniano
24	SLLGGITVV	Melanoma, cáncer de cerebro, cáncer de útero
25	SLDSSGFSL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma
26	GLALLYSGV	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, melanoma, cáncer de útero, carcinoma hepatocelular
27	STTNGGILTV	Cancer de mama

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
28	GLIDSLMAYV	Cáncer de pulmón amicrocítico, linfoma no hogdkiniano, melanoma, cáncer de esófago, cáncer escamoso de cabeza y cuello
29	ALSSPPPTV	Cáncer de cerebro, cáncer de esófago, cáncer escamoso de cabeza y cuello
30	ILDISRSEV	Carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de útero
31	SLFDGIATGL	Cáncer de cerebro, carcinoma hepatocelular, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de útero
32	YQAPDIDVQL	Cáncer gástrico, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, Melanoma
33	VLFGEITRL	Carcinoma hepatocelular, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda
34	ALLDEQQVNV	Cáncer de células renales, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, cáncer escamoso de cabeza y cuello
35	KLPEPPPLA	Cáncer de útero
39	AMASHLTST	Carcinoma hepatocelular
41	FLDDGNQMLL	Melanoma, cáncer escamoso de cabeza y cuello
45	IIDSSPTAL	Carcinoma hepatocelular, Melanoma, cáncer de útero
46	SLFIGAEIVAV	Cáncer colorrectal
49	SLIGGTNFV	Leucemia mielógena aguda, cancer de mama, melanoma
50	VLANRVAVV	Linfoma no hogdkiniano
51	ALLDKAQINL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario
53	ILVQVIPVV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, cancer de mama, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
55	KLLETKWTL	Cáncer de ovario, cáncer de pulmón amicrocítico
56	ILLRDLPTL	Carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, linfoma no hogdkiniano, cancer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero
57	GLAHFVNEI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cerebro, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, melanoma, cáncer de útero

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
58	GLDSSVNVQGSVL	Cáncer de pulmón amicrocítico, carcinoma hepatocelular, linfoma no hogdkiniano, Melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero
59	WLSTSIPEA	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer escamoso de cabeza y cuello
60	SLSDVRVIV	Cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
61	VLLDNLPGV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
62	GQLDFSEFL	Cáncer de cerebro, Melanoma
63	LLAGLLVGV	Cáncer de pulmón microcítico
64	GLLSQGSPL	Cáncer escamoso de cabeza y cuello
65	IITDLLRSV	Cáncer de páncreas, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, Melanoma, cáncer de ovario
66	SLWEENQAL	Cancer de mama, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
67	FLTPPLLSV	Cáncer de cerebro, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de útero
68	TMIVSLAAV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cerebro, cáncer colorrectal, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, melanoma, cáncer de útero, cáncer escamoso de cabeza y cuello
69	QIWDKILSV	Cáncer de páncreas, linfoma no hogdkiniano
70	KLAEISLGV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cancer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
71	LLSEDFVSV	Cancer de mama, melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
73	VLKVFLENV	Cáncer gástrico, cáncer de páncreas, leucemia mielógena aguda, melanoma, carcinoma hepatocelular, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
74	LLQEGEVYSA	Cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
77	KVFGGFQVV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de células renales
78	FIPDFAVAI	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, cancer de mama, linfoma no hogdkiniano
79	FLDPATPRV	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
80	ILLDTPLFLL	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cancer de mama
83	VILDKYYFL	Cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas, cáncer escamoso de cabeza y cuello
84	ALDPASISV	Carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de pulmón amicrocítico, cancer de mama, cáncer escamoso de cabeza y cuello
85	HLLDSKVPSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer escamoso de cabeza y cuello
87	RLLELLQEA	Cancer de mama, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
89	YLFPETEFI	carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata
90	GMTELYFQL	Cáncer de páncreas, cáncer escamoso de cabeza y cuello
91	NLDAATYQV	Cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cancer de mama, cáncer de útero
92	ALLDEQQVNVLL	Cáncer de células renales, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
93	LLDLIQTKV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, melanoma, cáncer de ovario
94	ALADGVPVAL	Leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
95	YLIGQHVTA	Cáncer de células renales, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer escamoso de cabeza y cuello
96	KLTNGIWVL	Leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico
97	TVGPGLLGV	Cáncer de células renales, cáncer de cerebro, carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer de útero
98	YLIGLDPENLAL	Cáncer de cerebro, carcinoma hepatocelular, cáncer escamoso de cabeza y cuello
99	ALIGDDVGL	Cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, Melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico
100	SLQSFIHGV	Cáncer de cerebro, cáncer colorrectal
101	ILDEMRAQL	Cancer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer escamoso de cabeza y cuello
102	GLYEGLDWL	Cáncer de páncreas, leucemia mielógena aguda
103	GLYSGEVLV	Cancer de mama, leucemia mielógena aguda
104	NAVVELVTV	Cáncer gástrico, cáncer de páncreas
105	TLFPSKIGV	Cáncer de útero
106	ILLDTPLFL	Carcinoma hepatocelular, cancer de mama, leucemia mielógena aguda
108	YLDPNQRDL	Brain Cancer, Melanoma
109	RLIDDMVAQA	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
110	VLFNIDGQGNHV	Cancer de mama, melanoma
111	LLDVTPKAV	Cáncer de cerebro, linfoma no hogdkiniano, melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
112	YLDPSLNSL	Cáncer de cerebro
113	FVFEPPPGV	Linfoma no hogdkiniano, cancer de mama, melanoma, cáncer escamoso de cabeza y cuello
114	IITKDLFQV	Cáncer de útero, melanoma
115	SLLDFERSL	Carcinoma hepatocelular, cancer de mama, Melanoma

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
116	QLAWFDTDL	Cáncer de células renales, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cancer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
117	YMLDIFHEVL	Cáncer escamoso de cabeza y cuello
118	RLLDFPTLLV	Leucemia mielógena aguda, cáncer de ovario
120	IIIPEIQKV	Cáncer gástrico, cáncer de páncreas
121	QLQGYLRSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, linfoma no hogdkiniano, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
122	ILEPSLYTV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, Melanoma, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, cáncer escamoso de cabeza y cuello
123	NLAGVYSEV	Melanoma, cáncer de esófago, cáncer de útero
124	QIDGTLSTI	Leucemia mielógena aguda, cáncer de cerebro
125	VLDEGSASV	Cáncer colorrectal, linfoma no hogdkiniano, cáncer de esófago, leucemia linfocítica crónica
126	SLLRVGWSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de ovario, cáncer escamoso de cabeza y cuello
127	KLNATNIEL	Cancer de mama, cáncer de esófago
128	KLWGQSIQL	Linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, cáncer de esófago, cáncer escamoso de cabeza y cuello
129	YLEPKLTQV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma hepatocelular, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
131	ILTSIQSLL	Leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, carcinoma

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
		hepatocelular, leucemia mielógena aguda, cáncer escamoso de cabeza y cuello
132	YILEGEPGKV	Cáncer de pulmón microcítico, Melanoma, cáncer de esófago, carcinoma hepatocelular, cáncer escamoso de cabeza y cuello
133	GLDPLGYEIQL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
134	IVAPGTFEV	Cáncer de células renales, cáncer de cerebro, carcinoma hepatocelular, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer gástrico
135	FLLPLIIVL	Linfoma no hogdkiniano, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, melanoma, leucemia mielógena aguda, cáncer escamoso de cabeza y cuello
136	GLSEPIFQL	Melanoma
137	ALFPHLLQPVL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, carcinoma hepatocelular, leucemia linfocítica crónica, MCC, Melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer escamoso de cabeza y cuello
138	YLTNEGIQYL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, Melanoma, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer escamoso de cabeza y cuello
139	LLYPTEITV	Cáncer de células renales, Melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
140	ALLDGRVQL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, melanoma, cáncer de esófago,

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
		cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
141	SMFGAGLTV	Cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, leucemia mielógena aguda, cancer de mama, Melanoma
142	FLGENISNFL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, Melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
143	TLVTGLASV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, cancer de mama, Melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer escamoso de cabeza y cuello
144	YLAGEAPTL	Carcinoma hepatocelular, leucemia linfocítica crónica, linfoma no hogdkiniano, leucemia mielógena aguda, Melanoma, cáncer de útero, cáncer escamoso de cabeza y cuello
145	ALYPGQLVQL	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, linfoma no hogdkiniano
146	YLARIQGFQV	Cáncer de ovario, leucemia mielógena aguda, linfoma no hogdkiniano
147	QMLELITRL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, leucemia mielógena aguda, linfoma no hogdkiniano
148	TLGVIPESV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, leucemia mielógena aguda, linfoma no hogdkiniano, cáncer escamoso de cabeza y cuello
149	VLLRVLILL	Cáncer de páncreas, leucemia linfocítica crónica, cancer de mama, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido conforme con la presente invención acorde con la SEQ ID N.º 64, para – en una forma de realización preferida combinada – el tratamiento del cáncer de pulmón amicrocítico.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los péptidos acordes con la presente invención para –preferiblemente combinados– el tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada entre el grupo de cáncer de vejiga urinaria, leucemia mielógena aguda (LMA), cáncer de mama, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (LLC), carcinoma colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (CHC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico y cáncer de útero.

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 alargada (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 64.

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

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

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos acordes con la presente invención. La presente invención se refiere, además, al ácido

nucleico acorde con la presente invención que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 64, preferiblemente la SEQ ID N.º 64, 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, dicho medicamento es activo contra el cáncer.

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

La presente invención concierne, además, al uso acorde con la presente invención, en que dichas células tumorales son de cáncer de vejiga urinaria, leucemia mielógena aguda (LMA), cáncer de mama, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (LLC), carcinoma colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (CHC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico y cáncer de útero, y preferiblemente de células de cáncer de vejiga urinaria.

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

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

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

Se ha observado que ARF1 se sobreexpresa en estirpes celulares de cáncer de mama de gran invasividad así como en tumores de mama de los subtipos avanzados y más agresivos, y que desempeña un papel clave en la invasión de las células cancerosas mamarias a través de la regulación de la vía Rho/MLC. Así, se ha visto que la expresión reducida de ARF1 altera el crecimiento de los tumores primarios de mama e inhibe la metástasis pulmonar en un modelo de xenoinjerto en ratón. La sobreexpresión de ARF1 en la estirpe celular de cáncer de mama MCF7 (ER+) conduce a la transición epitelio-mesenquimática, en la que ARF1 controla la adhesión entre las células, la activación oncógena de Ras y la expresión de inductores de la citada transición (Schlienger et al., 2016; Schlienger et al., 2014). El ARF1 ha aparecido regulado al alza en el cáncer de próstata. Se ha constatado que la transmisión aberrante de señales oncógenas por la vía de MAPK que ocurre en el cáncer de próstata está controlada, al menos en parte, por el ARF1, lo cual señala a este gen como posible regulador crítico de la progresión de este cáncer y podría hacer de él una diana molecular clave para su diagnóstico y su tratamiento (Davis et al., 2016).

Se ha visto que el ARF3 es un gen con expresión desregulada situado en el interior de una región de rotura en las estirpes de células de cáncer de mama epitelial transformadas por radiación B42-11 y B42-16 (Unger et al., 2010). Se ha observado que el ARF3 aparece regulado a la baja en el cáncer gástrico primario (Chang et al., 2009).

El ARF4 ha sido implicado en el adenocarcinoma de pulmón (Bidkhori et al., 2013). Además, se le ha descrito como un mediador en la vía de transmisión de señales dependiente del EGF. Por lo cual, se ha observado que la regulación del ARF4 interviene en la migración de las células cancerosas mamarias, por lo que tal vez podría servir como diana terapéutica para el tratamiento de la invasión y la metástasis en el cáncer de mama (Jang et al., 2012).

Las mutaciones de COL6A3 predijeron significativamente una mejor supervivencia global en los pacientes con carcinoma colorrectal independientemente de la diferenciación del tumor y de su estadificación TNM (Yu et al., 2015). Se ha descrito que la expresión de COL6A3 es elevada en el cáncer de páncreas, en el de colon y en el gástrico, en los carcinomas mucoepidermoides y en el cáncer de ovario. Se han detectado variantes de transcripción relacionadas con el cáncer que incluían los exones 3, 4 y 6 en el cáncer de colon, el cáncer de vejiga, el de próstata y el de páncreas (Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008). En el cáncer de ovario los niveles de COL6A3 se correlacionaron con un grado tumoral más elevado y, en el cáncer de páncreas, se ha demostrado que podría servir como biomarcador sérico para el diagnóstico (Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014).

La mutación de IDH1 ha sido descrita como un importante marcador pronóstico del glioma y ha resultado ser común en el glioma de grado II-III y en el glioblastoma secundario. Así pues, el IDH1 mutante podría desempeñar un papel crítico en la proliferación celular y en la angiogenia del glioma (Zhang et al., 2015b; Shi et al., 2016). Las mutaciones del IDH1 y otras diversas mutaciones han sido descritas como alteraciones genéticas recurrentes que concurren simultáneamente con la codeleción 1p/19q y que posibilitan la identificación de los oligodendrogliomas (Cahill et al., 2015). Se ha observado que una recién descubierta mutación del IDH1 de carácter metabólico está vinculada con el cáncer de páncreas metastásico; ha sido descrita como una rara oportunidad para diseñar un tratamiento dirigido que constituiría una opción para combatir el adenocarcinoma ductal pancreático (Brody et al., 2016).

Diversos estudios han demostrado que el nivel de LAMA5 aparece elevado en el carcinoma basocelular, el cáncer de cuello uterino y el carcinoma de mama (Simonova et al., 2015; Scotto et al., 2008; Mostafa et al., 2010; Georgiou et al., 2013).

Se ha descrito que el LRRC1 aparece regulado al alza de forma aberrante en muestras de tejido de carcinoma hepatocelular con respecto al tejido hepático sano adyacente (Li et al., 2013).

NUP107 codifica la nucleoporina 107, miembro de la familia de las nucleoporinas. Es un componente esencial del complejo del poro nuclear (RefSeq, 2002). La fusión de MDM1 con NUP107 ha sido identificada como un episodio recurrente de corte y empalme alternativo en los trombos tumorales de la vena porta, la complicación más grave del carcinoma hepatocelular, en comparación con muestras equivalentes de ese mismo tipo de tumor. Se ha descrito la regulación al alza de NUP107 en una estirpe de células pancreáticas provista de un alto potencial de invasión-metástasis con respecto a otra estirpe de células del páncreas dotada de un bajo potencial (Zhang et al., 2015a; Tan et al., 2010).

El gen OSR1 aparece metilado en el cáncer gástrico lo que causa su regulación a la baja, que aparece correlacionada con una supervivencia breve. La sobreexpresión de OSR1 inhibe el crecimiento celular, lo que deriva en la parada del ciclo celular y en la inducción de la muerte celular por apoptosis en estirpes celulares de cáncer gástrico. Asimismo, el OSR1 promueve la transcripción de p53, p21, Fas y del receptor de muerte 5 y reprimió la expresión de TCF-1, ciclina D1, cinasa 4 dependiente de ciclina, beta-catenina citoplasmática y LEF1 (Otani et al., 2014; Huang et al., 2004). OSR1 aparece metilado diferencialmente en el adenocarcinoma de pulmón por lo que podría servir como biomarcador (Rauch et al., 2012; Daugaard et al., 2016). OSR1 es un marcador del mesodermo intermedio (Zhang et al., 2011; So and Danielian, 1999; Oeda et al., 2013). El arsénico actúa específicamente sobre las células madre y las células progenitoras parcialmente diferenciadas propiciando la transformación oncógena que desemboca en la sobreexpresión del OSR1 (Tokar et al., 2013).

Se ha comprobado que el PKP1 aparece regulado a la baja en el cáncer de próstata y en el adenocarcinoma de esófago (Kaz et al., 2012; Yang et al., 2015). La reducción de la expresión de PKP1 en la estirpe de células prostáticas no neoplásicas BPH-1 condujo

a la reducción de la apoptosis y a la expresión diferencial de genes como el gen SPOCK1 asociado con el cáncer de próstata (Yang et al., 2015).Colectivamente, la expresión alterada de PKP1 y de SPOCK1 parece ser un episodio frecuente y crítico en el cáncer de próstata y se ha sugerido que el PKP1 podría ejercer una función oncosupresora (Yang et al., 2015). Se ha observado que la expresión reducida del PKP1 está asociada con un tiempo hasta la aparición de metástasis a distancia sustancialmente más breve en el carcinoma epidermoide de la cavidad bucal (Harris et al., 2015). Se ha descrito que la pérdida del PKP1 por la metilación de su promotor aparece asociada con la progresión del esófago de Barrett en adenocarcinoma de esófago (Kaz et al., 2012). Se ha comprobado que el PKP1 aparece regulado al alza en el cáncer de pulmón amicrocítico y que podría ser un buen marcador para distinguir las muestras de carcinomas epidermoides (Sanchez-Palencia et al., 2011). Se ha constatado que el PKP1 está regulado al alza en la estirpe de células diferenciadas de liposarcoma GOT3 (Persson et al., 2008). Se ha descrito que la disminución de la expresión de PKP1 promueve el aumento de la motilidad en las células de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Sobolik-Delmaire et al., 2007). Se ha afirmado que la pérdida del PKP1 está asociada con la oncogenia del cuello uterino (Schmitt-Graeff et al., 2007). Se ha observado que el PKP1 está asociado con la recurrencia local o con metástasis así como con una supervivencia breve en pacientes con carcinoma epidermoide de la bucofaringe (Papagerakis et al., 2003).

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

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o más aminoácidos, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos de la invención) pueden tener hasta 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 o más aminoácidos de longitud.

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

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

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

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

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

Un «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, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y HLA-B*07 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos locus.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje de identidad», al referirse a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces con la siguiente fórmula:
Identidad porcentual = 100 [1 -(C/R)]
donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, donde
(i) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
(ii) cada hueco (gap) de la secuencia de referencia y
(iii) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y
(iiii) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

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

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

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 64 o una variante de la misma que es un 88% homóloga a la SEQ ID N.º 64, o 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 u otras herramientas.

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

Por «variante» de la secuencia de aminoácidos dada, los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicadas en la SEQ ID N.º 64. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de linfocitos T activados.

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía y de las bases de datos científicas, ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión.

Así pues, una persona versada en la técnica será capaz de modificar las secuencias de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 64, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y será capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unión a moléculas MHC de clase I o II. Las variantes de la presente invención conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que contenga la

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 6: Variantes y motivos de los péptidos acordes con las SEQ ID N.º 3 y 15.

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SEQ ID N.º 3	Y	L	D	E	I	P	P	K	F	S	M	
Variantes											V	
											I	
											L	
											A	
		M									V	
		M									I	
		M									L	
		M									A	
		A									V	
		A									I	
		A									L	
		A									A	
		V									V	
		V									I	
		V									L	
		V									A	
		T									V	
		T									I	
		T									L	
		T									A	
		Q									V	
		Q									I	
		Q									L	
		Q									A	
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SEQ ID N.º 15	Y	L	A	P	E	N	G	Y	L	M	E	A
Variantes												V

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

También pueden ser adecuados péptidos más largos (alargados). 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.

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

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

C-terminal	N-terminal

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

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

Así pues, los 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.

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

En consecuencia, la presente invención también proporciona péptidos y variantes de 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.

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.

En una forma de realización preferida de la invención el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 64.

«Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a la SEQ ID N.º 64 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 y cols. (1997) (Meziere et al., 1997), y que se incorporan en la presente memoria como referencia. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (Meziere et al., 1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH2-NH, -CH2S-, -CH2CH2-, -CH=CH-, -COCH2-, -CH(OH)CH2- y -CH2SO-. La patente de EE. UU. 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos ($-CH_2$-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 hidrofóbicos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden

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

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

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

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

La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro. El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico. Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los residuos de lisina y otros grupos alfa-amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etilen)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas. Los residuos de metionina de las proteínas se pueden modificar por ejemplo, con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.

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

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

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

Un péptido o variante que está modificado o que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención.

Una forma de realización de la invención se refiere además a los péptidos descritos previamente en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 64 y ha sido producida sintéticamente (p. ej. sintetizada) en forma de una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los métodos para la síntesis de péptidos son bien conocidos en la materia. 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 condiciones in vivo. De la forma artificial de sal del péptido depende su solubilidad, en particular en el contexto de composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos, como por ejemplo, las vacunas peptídicas que se dan a conocer en la presente memoria. Para que los péptidos se puedan suministrar de modo eficaz al sujeto a tratar, es preciso que el péptido o péptidos tengan la suficiente solubilidad, por lo menos sustancial. Preferiblemente, las sales de los péptidos deben ser sales farmacéuticamente aceptables. Estas sales conformes a la invención incluyen sales alcalinas y alcalinotérreas como las sales de la serie de Hofmeister que comprenden aniones como PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, CH_3COO^-, Cl^-, Br^-, NO_3^-, ClO_4^-, I^-, SCN^- y cationes como NH_4^+, Rb^+, K^+, Na^+, Cs^+, Li^+, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} y Ba^{2+}. En concreto, las sales se seleccionan entre las siguientes: $(NH_4)_3PO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4CH_3COO, NH_4Cl, NH_4Br, NH_4NO_3, NH_4ClO_4, NH_4I, NH_4SCN, Rb_3PO_4, Rb_2HPO_4, RbH_2PO_4, Rb_2SO_4, Rb_4CH_3COO, Rb_4Cl, Rb_4Br, Rb_4NO_3, Rb_4ClO_4, Rb_4I, Rb_4SCN, K_3PO_4, K_2HPO_4, KH_2PO_4, K_2SO_4, KCH_3COO, KCl, KBr, KNO_3, $KClO_4$, KI, $KSCN$, Na_3PO_4, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4,

Na_2SO_4, $NaCH_3COO$, NaCl, NaBr, $NaNO_3$, $NaClO_4$, NaI, NaSCN, $ZnCl_2$ Cs_3PO_4, Cs_2HPO_4, CsH_2PO_4, Cs_2SO_4, $CsCH_3COO$, CsCl, CsBr, $CsNO_3$, $CsClO_4$, CsI, CsSCN, Li_3PO_4, Li_2HPO_4, LiH_2PO_4, Li_2SO_4, $LiCH_3COO$, LiCl, LiBr, $LiNO_3$, $LiClO_4$, LiI, LiSCN, Cu_2SO_4, $Mg_3(PO_4)_2$, Mg_2HPO_4, $Mg(H_2PO_4)_2$, Mg_2SO_4, $Mg(CH_3COO)_2$, $MgCl_2$, $MgBr_2$, $Mg(NO_3)_2$, $Mg(ClO_4)_2$, MgI_2, $Mg(SCN)_2$, $MnCl_2$, $Ca_3(PO_4)$,, Ca_2HPO_4, $Ca(H_2PO_4)_2$, $CaSO_4$, $Ca(CH_3COO)_2$, $CaCl_2$, $CaBr_2$, $Ca(NO_3)_2$, $Ca(ClO_4)_2$, CaI_2, $Ca(SCN)_2$, $Ba_3(PO_4)_2$, Ba_2HPO_4, $Ba(H_2PO_4)_2$, $BaSO_4$, $Ba(CH_3COO)_2$, $BaCl_2$, $BaBr_2$, $Ba(NO_3)_2$, $Ba(ClO_4)_2$, BaI_2 y $Ba(SCN)_2$. En particular se prefieren el NH acetato, $MgCl_2$, KH_2PO_4, Na_2SO_4, KCl, NaCl y $CaCl_2$, como por ejemplo, las sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato).

En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contiene enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados p. ej., utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestra Lukas y cols. (Lukas et al., 1981) y las referencias que aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-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-trimetilbencenosulfonílicos (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 (scavengers) utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo (Bruckdorfer et al., 2004) y las referencias citadas en la misma).

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

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

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

Para seleccionar los péptidos sobrepresentados se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación mediana de la muestra así como la variación de los duplicados. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con muestras de tejido normal de referencia. Cada uno de esos perfiles se puede después consolidar en una puntuación de sobrepresentación calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (Pinheiro et al., 2015) ajustando para el análisis múltiple con la Tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*) (Benjamini and Hochberg, 1995) (Véase el ejemplo 1, figura 1).

Para la identificación y la cuantificación relativa de los ligandos HLA mediante espectrometría de masas se purificaron moléculas HLA de muestras de tejido criogenizadas y se aislaron los péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y se identificaron sus secuencias mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con ionización por nano-electronebulización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de fragmentación de los péptidos asociados a tumores (TUMAP) naturales registrados a partir de muestras de cáncer de vejiga urinaria (N= 15 muestras positivas para A*02) con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación de los péptidos identificados en tejido de cáncer primario obtenido de 15 pacientes con cáncer de vejiga urinaria.

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

espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

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

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

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

Aparte de la sobrepresentación del péptido, se ha analizado la expresión del ARNm del gen originario. Los datos del ARNm se obtuvieron mediante análisis RNASeq de tejidos normales y tejidos cancerosos (véase el Ejemplo 2, Figura 2). Otra fuente más de datos de tejidos normales consistió en una base de datos de expresión de ARN de acceso público, creada con unas 3000 muestras de tejido normal (Lonsdale, 2013). En la presente invención se incluyeron preferentemente péptidos derivados de las proteínas

cuyo ARNm se expresa con profusión en el tejido canceroso, pero muy poco o nada en tejidos normales vitales.

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

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

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

Los péptidos de la presente invención han demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están sobrepresentados y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención (véanse el Ejemplo 3 y el Ejemplo 4). Asimismo, cuando los péptidos están formando un complejo con el MHC correspondiente pueden ser utilizados también para la producción de anticuerposy/o TCR, en concreto TCR solubles,

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

La presente descripción también se refiere a los receptores de los linfocitos T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta (“TCR alfa/beta”). También se proporcionan péptidos HAVCR1-001 capaces de unirse a los TCR y anticuerpos cuando están presentados por una molécula de MHC. La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células huésped para la expresión de TCR y péptidos de la presente descripción; y métodos para la utilización de los mismos.

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

En una realización, la descripción proporciona un método para producir un TCR como se ha descrito en la presente memoria, en el que dicho método comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar el TCR en condiciones adecuadas para estimular la expresión del TCR.

En otro aspecto, la descripción se refiere a métodos según la descripción en los que el antígeno se carga en moléculas de clase I o II MHC expresadas en la superficie de una célula adecuada presentadora de antígeno o una célula presentadora de antígeno artificial poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno, o cargando el antígeno en tetrámeros de MHC de clase I o II mediante la conversión en tetrámeros de los monómeros del complejo formado por antígeno/MHC de clase I o II.

Las cadenas alfa y beta de los TCR alfa/beta, y las cadenas gamma y delta de los TCR gamma/delta, se considera generalmente que tienen dos «dominios», a saber: los dominios variable y constante. El dominio variable consiste en una concatenación de región variable (V) y de región de unión (J). El dominio variable puede incluir también una región líder (L). Las cadenas beta y delta pueden incluir también una región de diversidad (D). Los dominios constantes alfa y beta pueden incluir también dominios transmembranarios (TM) en el extremo C-terminal, que anclan las cadenas alfa y beta a la membrana celular.

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

Los TCR de la presente descripción se unen preferiblemente a un complejo de péptido HAVCR1-001-molécula de HLA con una afinidad de unión (KD) de aproximadamente 100 μM o menos, aproximadamente 50 μM o menos, aproximadamente 25 μM o menos, o aproximadamente 10 μM o menos. Son más preferidos los TCR de elevada afinidad, que

presentan afinidades de unión de aproximadamente 1 μM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos. Los ejemplos no limitantes de los intervalos preferidos de afinidades de unión de los TCR de la presente invención incluyen desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 10 nM; desde aproximadamente 10 nM hasta aproximadamente 20 nM; desde aproximadamente 20 nM hasta aproximadamente 30 nM; desde aproximadamente 30 nM hasta aproximadamente 40 nM; desde aproximadamente 40 nM hasta aproximadamente 50 nM; desde aproximadamente 50 nM hasta aproximadamente 60 nM; desde aproximadamente 60 nM hasta aproximadamente 70 nM; aproximadamente 70 nM hasta aproximadamente 80 nM; desde aproximadamente 80 nM hasta aproximadamente 90 nM; y desde aproximadamente 90 nM hasta aproximadamente 100 nM.

Tal como se utiliza en la presente memoria en relación con los TCR de la presente descripción, «unión específica» y las variantes gramaticales de su expresión, se utilizan para referirse a TCR que tienen una afinidad de unión (KD) para un complejo de péptido HAVCR1-001-molécula de HLA de 100 μM o menos.

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

Independientemente de la inserción del enlace entre cadenas mencionado anteriormente, los TCR alfa/beta heterodiméricos de la presente descripción pueden tener una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, y la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio

constante TRBC1 o TRBC2 del TCR pueden estar unidas por el enlace disulfuro natural entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

Los TCR de la presente descripción pueden comprender un marcador detectable seleccionado a partir del grupo formado por un radionúclido, un fluoróforo y biotina. Los TCR de la presente descripción pueden estar conjugados con un agente terapéuticamente activo, tal como un radionúclido, un agente de quimioterapia, o una toxina.

En una realización, un TCR de la presente descripción que porta al menos una mutación en la cadena alfa y/o que porta al menos una mutación en la cadena beta tiene un patrón de glucosilación modificado en comparación con el TCR no mutado.

En una realización, un TCR que comprende al menos una mutación en la cadena alfa del TCR y/o la cadena beta del TCR tiene una afinidad de unión a, y/o una semivida de unión a, un complejo de péptido HAVCR1-001-molécula de HLA, que es por lo menos el doble de la de un TCR que comprende una cadena alfa no mutada del TCR y/o una cadena beta no mutada del TCR. El aumento de la afinidad de los TCR específicos de tumores, y su aprovechamiento, se basa en la existencia de un intervalo de afinidades óptimas del TCR. La existencia de dicho intervalo se basa en observaciones que indican que los TCR específicos para los patógenos restringidos por HLA-A2 tienen valores de KD que son aproximadamente 10 veces menores que los de los TCR específicos para autoantígenos asociados a tumores restringidos por HLA-A2. En la actualidad se sabe que, aunque los antígenos tumorales pueden ser inmunogénicos, debido a que los tumores se desarrollan a partir de las propias células del individuo, sólo las proteínas mutadas o que porten alteraciones debidas a procesamiento traduccional serán reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario. Los antígenos que están regulados al alza o sobreexpresados (los llamados autoantígenos) no inducirán necesariamente una respuesta inmunitaria funcional contra el tumor: los linfocitos T que expresan TCR que son muy reactivos contra estos antígenos habrán sido seleccionados negativamente en el interior del timo en un proceso conocido como tolerancia central, lo

que significa que solo permanecen los linfocitos T con TCR de baja afinidad para los autoantígenos. Por consiguiente, la afinidad de los TCR o de las variantes de la presente descripción por HAVCR1-001 puede aumentarse por métodos bien conocidos en la técnica.

La presente descripción se refiere también a un método para la identificación y el aislamiento de un TCR según la presente descripción, en el que dicho método comprende la incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/ HAVCR1-001, la incubación de las PBMC con los tetrámeros conjugados con ficoeritrina (PE), y el aislamiento de los linfocitos T de elevada afinidad mediante análisis y selección de células activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

La presente descripción también se refiere a un método para la identificación y el aislamiento de un TCR según la presente descripción, en que dicho método comprende la obtención de un ratón transgénico que porta todo el locus genético TCRαβ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresan un repertorio diverso de TCR humanos que compensan la deficiencia de TCR de los ratones, la inmunización del ratón con HAVCR1-001, la incubación de las PBMC obtenidas a partir de ratones transgénicos con tetrámeros conjugados con ficoeritrina (PE), y el aislamiento de los linfocitos T de elevada afinidad mediante análisis y selección de células activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

En un aspecto, para obtener linfocitos T que expresan TCR de la presente descripción, se clonan ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta de la presente descripción en vectores de expresión, tales como retrovirus gamma o lentivirus. Se generan virus recombinantes y después se analizan para comprobar sus características funcionales, tales como la especificidad antigénica y la afinidad funcional. Después se utiliza una parte alícuota del producto final para la transducción de la población diana de linfocitos T (purificada generalmente a partir de las del paciente), que se expande antes de su infusión en el paciente.

En otro aspecto, para obtener linfocitos T que expresen los TCR de la presente descripción, se sintetizan ARN de los TCR con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo: sistemas de transcripción in vitro. Los ARN de los TCR sintetizados in vitro se introducen después en los linfocitos CD8+ primarios obtenidos a partir de donantes sanos mediante electroporación para volver a expresar las cadenas, específicas del tumor, TCR-alfa y/o TCR-beta.

Para aumentar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden conectarse de forma funcional con promotores potentes, tales como las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, citomegalovirus (CMV), virus U3 de las células madre de ratón (MSCV), fosfoglicerato-cinasa (PGK), β-actina, ubiquitina, y un promotor compuesto del virus de los simios 40 (SV40)/CD43, factor de elongación (EF)-1a y el promotor del virus productor de focos esplénicos (SFFV). En una realización preferida, el promotor es heterólogo respecto al ácido nucleico que se va a expresar.

Además de promotores potentes, las casetes de expresión de TCR de la presente descripción pueden contener otros elementos que pueden potenciar la expresión transgénica, incluida una región central de polipurinas (cPPT), que facilita la traslocación al núcleo de los constructos lentivíricos (Follenzi et al., 2000), y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota americana (wPRE), que incrementa el nivel de la expresión transgénica al aumentar la estabilidad del ARN (Zufferey et al., 1999).

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

Para obtener un elevado nivel de expresión superficial de TCR es necesario que ambas cadenas TCR-alfa y TCR-beta del TCR introducidos se transcriban a niveles elevados. Con este fin, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción pueden

clonarse en constructos bicistrónicos en un solo vector, una estrategia que ha demostrado ser capaz de superar este obstáculo. La utilización de un sitio de entrada intrarribosómico vírico (IRES) entre las cadenas TCR-alfa y TCR-beta permite la expresión coordinada de ambas cadenas, ya que las cadenas TCR-alfa y TCR-beta se generan a partir de un solo transcrito que se escinde en dos proteínas durante la traducción, con lo que se garantiza la producción de cadenas TCR-alfa y TCR-beta con la misma relación molar. (Schmitt et al. 2009).

Los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden tener los codones optimizados para aumentar la expresión en una célula huésped. La redundancia del código genético permite que algunos aminoácidos estén codificados por más de un codón, pero algunos codones son menos “óptimos” que otros debido a la disponibilidad relativa de los correspondientes ARNt, así como a otros factores (Gustafsson et al., 2004). La modificación de las secuencias de los genes de TCR-alfa y TCR-beta de modo que cada aminoácido esté codificado por el codón óptimo para la expresión genética en mamíferos, así como la eliminación de los motivos de inestabilidad del ARNm o de sitios de ayuste crípticos, ha demostrado aumentar significativamente la expresión de los genes TCR-alfa y TCR-beta (Scholten et al., 2006).

Además, la falta de emparejamiento (mispairing) entre las cadenas de TCR introducidas y las endógenas puede dar lugar a la adquisición de características específicas que puedan constituir un riesgo significativo de respuestas autoinmunitarias. Por ejemplo, la formación de dímeros mixtos de TCR puede reducir el número de moléculas de CD3 disponibles para formar complejos de TCR con el emparejamiento adecuado, por lo que puede disminuir significativamente la afinidad funcional de las células que expresan el TCR introducido (Kuball et al., 2007).

Para reducir la falta de emparejamiento, el dominio C-terminal de las cadenas de TCR introducidas según la presente descripción pueden modificarse con el objeto de estimular la afinidad entre las cadenas, mientras se disminuye la capacidad de las cadenas introducidas de emparejarse con las cadenas endógenas de TCR. Estas estrategias

pueden incluir la sustitución de los dominios C-terminales de TCR-alfa y TCR-beta humanos con sus dominios equivalentes en ratones (dominio C-terminal “murinizado”); la generación de un segundo enlace disulfuro entre las cadenas en el dominio C-terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína en ambas cadenas TCR-alfa y TCR-beta del TCR introducido (modificación de cisteínas); el intercambio de los residuos que interaccionan en los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta («saliente en hueco», knob-in-hole); y la fusión de los dominios variables de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta directamente con CD3ζ (fusión con CD3ζ). (Schmitt et al. 2009).

En una realización, una célula huésped se modifica para que exprese un TCR de la presente descripción. En realizaciones preferidas, la célula huésped es un linfocito T o un progenitor de linfocitos T humano. En algunas realizaciones el linfocito T o progenitor de linfocitos T se obtiene a partir de un paciente aquejado de cáncer. En otras realizaciones el linfocito T o progenitor de linfocitos T se obtienen a partir de un donante sano. Las células huésped de la presente descripción pueden ser alogénicas o autólogas respecto al paciente que se va a tratar. En una realización la célula huésped es un linfocito T gamma/delta transformado para que exprese un TCR alfa/beta.

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

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo –NH2 neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej., ácido acético, ácido propiónico, ácido

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

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

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

cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, en el caso de los epítopos de MHC de clase I que estimulan a los linfocitos T CD8 la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítopos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 64 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o el del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para

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

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

En otra forma de realización dos o más péptidos o variantes peptídicas de la invención se codifican y se expresan en orden sucesivo (similar a constructos de «collar de cuentas»). Al hacerlo, los péptidos o los variantes peptídicas se pueden enlazar o fusionar juntas mediante segmentos de aminoácidos enlazantes, como por ejemplo LLLLLL, o se pueden unir sin ningún otro péptido adicional entre ellos. Estos constructos

también pueden ser utilizados para la terapia contra el cáncer, y podrían inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

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

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véanse por ejemplo Cohen y cols. (Cohen et al., 1972) y (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman y

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

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

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

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

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

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

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Una perspectiva general se puede consultar por ejemplo en Teufel y cols.(Teufel et al., 2005). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un 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 (TH) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de 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). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej., el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej., GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. N.º 5.849.589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej., la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo)

a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos TH1 y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, y se han obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej., AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como

ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafilo, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimús, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmunitario (p. ej., anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

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

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante 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, (Kibbe, 2000). La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2112253, por ejemplo.

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

Tal y como se emplea en la presente memoria, el término «soporte» se refiere a una molécula que se une específicamente a un determinante (p. ej., antigénico). En una forma de realización, un soporte es capaz de dirigir la entidad a la que se ha unido (p.

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

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

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

puede lograr mediante microscopía de fluorescencia o de barrido láser o por citometría de flujo.

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

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

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

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

Es posible seleccionar aptámeros de ADN para desvelar propiedades de reconocimiento de amplio espectro contra varias células cancerosas, y particularmente las derivadas de tumores sólidos, en tanto que las células sanas primarias y no oncogénicas no son reconocidas. Si los aptámeros descubiertos reconocieran no solo un subtipo de tumor

concreto sino que interaccionaran con una serie de tumores, se convertirían en una herramienta aplicable para el diagnóstico y la terapéutica de amplio espectro.

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

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

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con cualquiera de la SEQ ID N.º 64, conforme con la presente invención con la molécula MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

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

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia de la SEQ ID N.º 64 o a una variante de la misma que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 64 o a una variante de la misma que induce la

reacción cruzada de los linfocitos T con dicho péptido en que dicho péptido no es un polipéptido entero subyacente.

La presente invención se refiere además a un péptido que comprende una secuencia de la SEQ ID N.º 64 o a una variante de la misma que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 64, 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 la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 64.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar

dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 64, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

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

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

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

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

La presente invención concierne además al uso acorde con la presente invención, en que dichas células tumorales son preferentemente células de cáncer de vejiga urinaria o células de otro tumor sólido o hematológico como cáncer de mama, leucemia mielógena aguda (LMA), cáncer de mama, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, leucemia linfocítica crónica (LLC), carcinoma colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vesícula

biliar, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular (CHC), carcinoma de células de Merkel, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de pulmón microcítico y cáncer de útero.

La presente invención se refiere, además, a biomarcadores basados en los péptidos acordes con la presente invención, aquí denominados «dianas», que pueden ser utilizados para el diagnóstico del cáncer, preferiblemente del cáncer de vejiga urinaria. 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 (poli)péptido marcador del cáncer de vejiga urinaria, introducción de una toxina en una célula de cáncer de vejiga urinaria que exprese un gen marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del cáncer de vejiga urinaria conforme a la invención.

Si es posible los anticuerpos de la invención se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entiende que para fabricar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto polipéptidos marcadores enteros de cáncer de vejiga urinaria, 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 64 del polipéptido, o una variante o fragmento de los mismos, se puede expresar en células procariotas (p. ej., bacterias) o eucariotas (p. ej., células de levadura, insecto o mamífero), a partir de las cuales se purificará la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador del cáncer de vejiga urinaria utilizado para generar el anticuerpo conforme a la invención.

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

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

secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (N.º pat. de EE.UU. 4.816.567, que se incorpora a la presente memoria íntegramente).

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

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (p. ej., con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

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

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad

de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la 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 mutagenia de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagenia dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

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

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

Se pueden emplear animales transgénicos (p. ej., ratones) que tras la inmunización sean capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin producir inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la 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 de Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución está situado aproximadamente entre 5 y 8, y más preferiblemente entre 7 y 7,5

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

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

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

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

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

Los anticuerpos o TCR también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína de 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.

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

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

La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE.UU. con el N.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de Drosophila Schneider line 2 está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Ljunggren y cols. (Ljunggren and Karre, 1985).
Preferentemente, la célula hospedadora no expresa sustancialmente moléculas MHC de clase I antes de la transfección. También es preferible que la célula estimuladora exprese una molécula importante que proporcione una señal coestimuladora para los linfocitos T, como B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase I y de las moléculas co-estimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

Si se utiliza como antígeno un 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 64, 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. (Plebanski et al., 1995) utilizan linfocitos de sangre periférica autóloga (PLB) para la preparación de los linfocitos T.

Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter y cols. (Walter et al., 2003) describen la estimulación *in vitro* de linfocitos T con

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

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

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

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 64.

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 de expresión en tejidos normales o que el gen está reprimido en los tejidos de los cuales deriva el tumor pero están expresados en el tumor. Por «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el nivel del polipéptido es como mínimo 1,2 veces mayor que el nivel en el tejido normal; preferiblemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferiblemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que el del tejido normal.

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

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

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

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

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

El equipo puede comprender, además, uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (V) una jeringa. El envase es

preferiblemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

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

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

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

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

Puesto que los péptidos de la invención se aislaron del cáncer de vejiga urinaria, el medicamento de la invención se usa preferentemente para tratar cáncer de vejiga urinaria.

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

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

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «archivo» (*warehouse*) designa un grupo de péptidos que han sido preseleccionados por su inmunogenicidad y/o 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 cáncer de vejiga urinaria 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 varias muestras de tejido de cáncer de vejiga urinaria, el archivo

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

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

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

5. La relevancia de la sobreexpresión al nivel del ARNm se confirmó volviendo a detectar en el tejido tumoral los TUMAP seleccionados en el paso 3 y comprobando que no se detectaban (o lo eran muy poco) en los tejidos sanos
6. Para evaluar si era factible que los péptidos seleccionados indujeran respuestas de linfocitos T *in vivo*, se llevaron a cabo pruebas de inmunogenicidad *in vitro* con linfocitos T humanos procedentes de donantes sanos y de pacientes con cáncer de vejiga urinaria.

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

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

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

Se recopilan los datos del fenotipo del HLA, transcriptómicos y peptidómicos del material tumoral y de muestras de sangre del paciente para identificar los péptidos más adecuados que contengan TUMAP contenidos en el «archivo» y exclusivos del paciente (es decir, mutados). Se escogerán los péptidos que se expresen de forma selectiva o

que se sobreexpresen en el tumor del paciente y, si es posible, que presenten una potente inmunogenicidad *in vitro* si se prueban con los PBMC del paciente.

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

Además de, o como alternativa a, la selección de péptidos con el modelo del archivo (base de datos), los TUMAP también se pueden identificar en el paciente *de novo* e incluirse después en la vacuna. A modo de ejemplo, los TUMAP candidatos se pueden identificar en el paciente mediante (a) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal que corresponde al tipo de tejido de la muestra del tumor para identificar proteínas que se sobreexpresan o se expresan de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante

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

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

asociado a tumor identificado en el paciente; y (d) opcionalmente, selección de al menos un péptido identificado de novo en el paso (a) para confirmar su inmunogenicidad.

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

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

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

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

Además de ser útiles para el tratamiento del cáncer, los péptidos de la presente invención también son útiles para el diagnóstico. Dado que los péptidos son generados a partir de muestras de células de cáncer de vejiga urinaria y se ha determinado que tales péptidos

no están presentes o lo están en niveles bajos en los tejidos normales, pueden ser utilizados para diagnosticar la presencia de un cáncer.

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

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

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

valiosa para el seguimiento en trasplantes, por ejemplo con el fin de detectar enfermedades del injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.

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

La presente invención se refiere preferiblemente a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 64, y los usos del mismo. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID N.º 2 a la SEQ ID N.º 3, de la SEQ ID N.º 5 a la SEQ ID N.º 63, de la SEQ ID N.º 65 a la SEQ ID N.° 118 o de la SEQ ID N.º 120 a la SEQ ID N.º 149 como ejemplos de referencia.

FIGURAS

Las Figuras 1A a 1R muestran la sobrepresentación de varios péptidos en tejidos normales (barras blancas) y del cáncer de vejiga urinaria (barras negras). Figura 1A: Símbolo del gen: GATA3, Péptido: VLFNIDGQGNHV (SEQ ID N.º 110); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 3 glándulas suprarrenales,16 células sanguíneas,15 vasos sanguíneos, 9 médulas óseas,10 cerebros,7 mamas, 6 esófagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 6 corazones, 12 riñones, 19 intestinos gruesos, 19 hígados, 45 pulmones, 7 ganglios linfáticos, 8 nervios, 3 ovarios, 8 páncreas, 3 glándulas paratiroideas, 1 peritoneo, 5 hipófisis, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 12 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 2 glándulas tiroides, 9 tráqueas, 6 uréteres, 5 úteros, 8 vejigas urinarias y 15 cánceres de vejiga urinaria. El péptido ha sido detectado además en 3/15 cánceres de vejiga urinaria. Figura 1B) Símbolo del gen: KRT7, Péptido: GLLKAYSIRTA (SEQ ID N.º 2); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 3 glándulas suprarrenales, 16 células sanguíneas, 15 vasos sanguíneos, 9 médulas óseas, 10 cerebros, 7 mamas, 6 esófagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 6 corazones, 12 riñones,

19 intestinos gruesos, 19 hígados, 45 pulmones, 7 ganglios linfáticos, 8 nervios, 3 ovarios, 8 páncreas, 3 glándulas paratiroideas, 1 peritoneo, 5 hipófisis, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 12 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 2 glándulas tiroides, 9 tráqueas, 6 uréteres, 5 úteros, 8 vejigas urinarias y 15 cánceres de vejiga urinaria. El péptido ha sido detectado además en 3/15 cánceres de vejiga urinaria. Figura 1C) Símbolo del gen: CXorf57, Péptido: YLDPSLNSL (SEQ ID N.º 112); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 3 glándulas suprarrenales, 16 células sanguíneas, 15 vasos sanguíneos, 9 médulas óseas, 10 cerebros, 7 mamas, 6 esófagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 6 corazones, 12 riñones, 19 intestinos gruesos, 19 hígados, 45 pulmones, 7 ganglios linfáticos, 8 nervios, 3 ovarios, 8 páncreas, 3 glándulas paratiroideas, 1 peritoneo, 5 hipófisis, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 12 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 2 glándulas tiroides, 9 tráqueas, 6 uréteres, 5 úteros, 8 vejigas urinarias y 15 cánceres de vejiga urinaria. El péptido ha sido detectado además en 3/15 cánceres de vejiga urinaria. Figura 1D) Símbolo del gen: DYNC1H, Péptido: FVFEPPPGV (SEQ ID N.º 113); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 3 glándulas suprarrenales, 16 células sanguíneas, 15 vasos sanguíneos, 9 médulas óseas, 10 cerebros, 7 mamas, 6 esófagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 6 corazones, 12 riñones, 19 intestinos gruesos, 19 hígados, 45 pulmones, 7 ganglios linfáticos, 8 nervios, 3 ovarios, 8 páncreas, 3 glándulas paratiroideas, 1 peritoneo, 5 hipófisis, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 12 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 4 testículos, 2 timos, 2 glándulas tiroides, 9 tráqueas, 6 uréteres, 5 úteros, 8 vejigas urinarias y 15 cánceres de vejiga urinaria. El péptido ha sido detectado además en 2/15 cánceres de vejiga urinaria. Figura 1E) Símbolo del gen: SNRNP70, Péptido: YLAPENGYLMEA (SEQ ID N.º 15); Tejidos de izquierda a derecha: 1 estirpe celular (1 riñón), 25 tejidos cancerosos (2 cánceres de colon, 1 leucemia leucocítica, 3 cánceres de hígados, 6 cánceres de pulmón, 3 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de próstata, 2 cánceres de piel, 3 cánceres de vejiga urinaria, 2 cánceres de útero). 1F: Péptido: GLWHGMFANV (SEQ ID N.º 10); Tejidos de izquierda a derecha: 8 estirpes celulares (1 de cabeza y cuello, 1 de ovario, 2 de

linfocitos, 3 de piel y 1 de cabeza y cuello), 1 tejido normal (1 bazo), 25 tejidos cancerosos (1 cáncer de cerebro, 1 leucemia leucocítica, 1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 3 cánceres de colon, 2 cánceres de hígado, 1 cáncer de cabeza y cuello, 1 cáncer de piel, 2 cánceres de ovario, 2 cánceres de cerebro, 7 cánceres de pulmón y 3 cánceres de vejiga urinaria); 1G: Péptido: RLSQLEGVNV (SEQ ID N.º 17); Tejidos de izquierda a derecha: 7 estirpes celulares (1 de linfocitos, 2 de piel y 4 de páncreas), 1 tejido normal (1 glándula suprarrenal), 15 tejidos cancerosos (1 cáncer de hígado, 2 cánceres de cabeza y cuello, 2 cánceres de ovario, 1 cáncer de pulmón, 1 cáncer de riñón, 3 cánceres de pulmón, 4 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero); 1H: Péptido: GLALLYSGV (SEQ ID N.º 26); Tejidos de izquierda a derecha: 7 estirpes celulares (1 de vejiga urinaria, 3 de linfocitos y 3 de páncreas), 1 tejido normal (1 pulmón), 18 tejidos cancerosos (1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 leucemia mielocítica, 7 cánceres de hígado, 2 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de pulmón, 3 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero); 1I: Péptido: GLIDSLMAYV (SEQ ID N.º 28); Tejidos de izquierda a derecha: 2 tejidos normales (1 de cabeza y cuello y 1 de timo), 27 tejidos cancerosos (11 cánceres de cabeza y cuello, 1 cáncer de piel, 1 cáncer de ganglios linfáticos, 2 cánceres de esófago, 9 cánceres de pulmón y 3 cánceres de vejiga urinaria); 1J: Péptido: SLIGGTNFV (SEQ ID N.º 49); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos normales (2 de ganglios linfáticos y 1 de bazo), 38 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloides, 2 leucemias mielocíticas, 1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de próstata, 3 cánceres de mama, 1 leucemia mielocítica, 2 cánceres de colon, 7 cánceres de hígado, 2 cánceres de piel, 8 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de esófago, 4 cánceres de pulmón, 3 cánceres de vejiga urinaria y 2 cánceres de útero); 1K: Péptido: ILLRDLPTL (SEQ ID N.º 56); Tejidos de izquierda a derecha: 14 estirpes celulares (9 de linfocitos, 4 benignas y 1 de páncreas), 11 tejidos normales (1 esófago, 2 hígados, 3 pulmones, 1 glándula paratiroides, 1 bazo, 1 estómago, 1 tiroides y 1 útero), 72 tejidos cancerosos (17 cánceres de próstata, 4 cánceres de mama, 2 cánceres de colon, 1 cáncer de vías biliares, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de hígado, 2 cánceres de cabeza y cuello, 1 cáncer de piel, 5 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de ovario, 2 cánceres de esófago, 1 cáncer de esófago y estómago, 1 cáncer de estómago, 20 cánceres de pulmón, 1 cáncer de páncreas, 7 cánceres de vejiga urinaria y 3 cánceres

de útero); 1L: Péptido: GLDSSVNVQGSVL (SEQ ID N.º 58); Tejidos de izquierda a derecha: 2 estirpes celulares (2 de leucocitos), 7 tejidos normales (1 glándula suprarrenal, 1 ganglio linfático y 5 bazos), 40 tejidos cancerosos (1 cáncer de colon, 1 cáncer de vías biliares, 1 cáncer de hígado, 2 cánceres de cabeza y cuello, 2 cánceres de piel, 4 cánceres de ganglios linfáticos, 6 cánceres de ovario, 1 cáncer de esófago y estómago, 1 cáncer de estómago, 17 cánceres de pulmón, 3 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero); 1M: Péptido: HLLDSKVPSV (SEQ ID N.º 85); Tejidos de izquierda a derecha: 2 tejidos normales (2 bazos), 25 tejidos cancerosos (1 cáncer de colon, 2 cánceres de hígado, 2 cánceres de cabeza y cuello, 2 cánceres de ovario, 2 cánceres de esófago, 1 cáncer de cerebro, 12 cánceres de pulmón y 3 cánceres de vejiga urinaria); 1N: Péptido: ALIGDDVGL (SEQ ID N.º 99); Tejidos de izquierda a derecha: 6 tejidos normales (2 muestras de leucocitos, 1 de linfocitos, 1 páncreas, 1 bazo y 1 timo), 34 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de médula ósea, 2 leucemias leucocíticas, 2 cánceres de colon, 1 cáncer colorrectal, 1 cáncer de vesícula biliar, 4 cánceres de cabeza y cuello, 2 cánceres de piel, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres de ovario, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de estómago, 9 cánceres de pulmón, 4 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero); 1O: Péptido: FVFEPPPGV (SEQ ID N.º 113); Tejidos de izquierda a derecha: 5 estirpes celulares (1 de piel, 1 de vejiga urinaria, 1 de ovario y 2 de páncreas), 25 tejidos cancerosos (1 cáncer de próstata, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de hígado, 2 cánceres de cabeza y cuello, 6 cánceres de piel, 1 cáncer de ganglios linfáticos, 2 cánceres de páncreas, 1 cáncer de cerebro, 2 cánceres de estómago, 4 cánceres de pulmón y 4 cánceres de vejiga urinaria); 1P: Péptido: QLQGYLRSV (SEQ ID N.º 121); Tejidos de izquierda a derecha: 10 estirpes celulares (1 de ovario, 2 cultivos primarios, 1 de linfocitos, 1 de leucocitos, 1 de riñón, 2 de recto y 2 de páncreas), 7 tejidos normales (1 glándula suprarrenal, 1 muestra de leucocitos, 3 médulas óseas, 1 colon y 1 tráquea), 36 tejidos cancerosos (1 cáncer de ciego, 1 cáncer de células mieloides, 1 leucemia leucocítica, 4 cánceres de colon, 1 cáncer de recto, 1 cáncer de vías biliares, 5 cánceres de hígado, 6 cánceres de cabeza y cuello, 1 cáncer de ganglio linfático, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de páncreas, 1 cáncer de cerebro, 9 cánceres de pulmón, 1 cáncer de vejiga urinaria y 2 cánceres de útero); 1Q: Péptido: ILEPSLYTV (SEQ ID N.º 122); Tejidos de izquierda a derecha: 13 estirpes celulares (1

de riñón, 2 de leucocitos, 1 de piel y 9 de páncreas), 10 tejidos normales (1 glándula suprarrenal, 5 colones, 1 hígado, 2 pulmones y 1 ganglio linfático), 63 tejidos cancerosos (2 cánceres de células mieloides, 2 leucemias leucocíticas, 1 cáncer de médula ósea, 2 cánceres de próstata, 4 cánceres de mama, 2 leucemias mielocíticas, 1 cáncer de colon, 1 cáncer de recto, 1 cáncer de vías biliares, 7 cánceres de hígado, 3 cánceres de cabeza y cuello, 5 cánceres de piel, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres de ovario, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de páncreas, 5 cánceres de cerebro, 4 cánceres de estómago, 5 cánceres de pulmón, 3 cánceres de riñón, 1 cáncer de pulmón, 4 cánceres de vejiga urinaria y 4 cánceres de útero); 1R: Péptido: YLEPKLTQV (SEQ ID N.º 129); Tejidos de izquierda a derecha: 25 estirpes celulares (1 de cabeza y cuello, 1 de ovario, 1 de PBMC, 2 de linfocitos, 3 de piel, 1 de riñón y 16 de páncreas), 8 tejidos normales (3 glándulas suprarrenales, 1 médula ósea, 1 cabeza y cuello y glándula salival, 1 riñón, 1 hígado y 1 bazo), 62 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de médula ósea, 1 leucemia leucocítica, 3 cánceres de próstata, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 2 cánceres de vías biliares, 6 cánceres de hígado, 3 cánceres de cabeza y cuello, 5 cánceres de piel, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de ovario, 2 cánceres de esófago, 2 cánceres de cerebro, 1 cáncer de estómago, 11 cánceres de pulmón, 1 cáncer de riñón, 4 cánceres de pulmón, 6 cánceres de vejiga urinaria y 6 cánceres de útero).

Las Figuras 2B a 2D muestran a título de ejemplo perfiles de expresión de genes originarios de la presente invención que se sobreexpresan con profusión o se expresan exclusivamente en el cáncer de vejiga urinaria en un conjunto de tejidos normales (barras blancas) y 10 muestras de cáncer de vejiga urinaria (barras negras). Tejidos de izquierda a derecha: 6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebros, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartílago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 hipófisis, 1 recto, 2 glándulas salivales, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 tiroides, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículo, 1 timo, 1 útero y

10 muestras de cáncer de vejiga urinaria. Figura 2B: Símbolo del gen: KRT7; Figura 2C: Símbolo del gen: CYP4F22; Figura 2D: Símbolo del gen: DHRS2.

La Figura 3 muestra datos de inmunogenicidad a título de ejemplo: resultados de la citometría de flujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido.

La Figura 4 muestra resultados a título de ejemplo de respuestas de linfocitos T CD8+ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-A*02+ en condiciones in vitro. Los linfocitos T CD8+ fueron estimulados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-A*02 formando un complejo con el péptido de SEQ ID N.º 30 (A, recuadro izquierdo), el péptido de SEQ ID N.º 50 (B, recuadro izquierdo) o el péptido de SEQ ID N.º 111 (C, recuadro izquierdo), respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D con multímeros con A*02/SEQ ID N.º 30 (A), A*02/SEQ ID N.º 50 (B) o A*02/SEQ ID N.º 111 (C). Los recuadros de la derecha (A, B y C) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos A*02/péptido irrelevantes. Los linfocitos CD8+ se seleccionaron entre las células en singlete viables. La aplicación de operadores booleanos ayudó a excluir los falsos positivos detectados con los multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

EJEMPLOS

La presente invención se refiere preferiblemente a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 64, y los usos del mismo. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID N.º 2 a la SEQ ID N.º 3, de la SEQ ID N.º 5 a la SEQ ID N.º 63, de la SEQ ID N.º 65 a la SEQ ID N.° 118 o de la SEQ ID N.º 120 a la SEQ ID N.º 149 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 los pacientes procedían de Asterand (Detroit, Michigan, EE. UU. y Royston, Herts, Reino Unido); Geneticist Inc. (Glendale, California, EE.UU.); ProteoGenex Inc. (Culver City, California, EE.UU.); Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido); y Hospital Universitario de Tubinga (Tubinga, Alemania).

Los tejidos normales se obtuvieron de Asterand (Detroid, Michigan, EE.UU. y Royston, Herts, EE.UU.); Bio-Options Inc. (Brea, California, EE.UU.); BioServe (Beltsville, Maryland, EE.UU.); Blutspendezentrale, Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin, Tubinga; Capital BioScience Inc. (Rockville, Maryland, EE.UU.); Geneticist Inc. (Glendale, California, EE.UU.); Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto (KPUM); ProteoGenex Inc. (Culver City, California, EE.UU.); Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido); Hospital Universitario de Ginebra (Ginebra, Suiza); Hospital Universitario de Heidelberg (Heidelberg, Alemania); y Hospital Universitario de Múnich (Múnich, Alemania); Hospital Universitario de Tubinga (Tubinga, Alemania).

Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica o la autopsia. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extirpación y permanecieron a -70 ºC 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 congeladas instantáneamente se obtuvieron por inmunoprecipitación de tejidos sólidos siguiendo un protocolo ligeramente modificado (Falk et al., Nature 351 (1991): 290-296; Seeger et al., Immunogenetics 49 (1999): 571-576) con el anticuerpo específico de HLA-A*02 BB7.2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarosa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

Análisis por espectrometría de masas

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

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

con la tendencia central para tener en cuenta la variación entre los duplicados técnicos y biológicos. De ese modo, cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo, todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra así como las variaciones de los duplicados. Los perfiles superponen muestras de cáncer de vejiga urinaria con muestras de tejido normal de referencia. La Figura 1 muestra perfiles de presentación de péptidos sobrepresentados y mostrados aquí a título de ejemplo. Las puntuaciones de presentación de péptidos mostrados a título de ejemplo se exponen en la Tabla 8.

Tabla 8: Puntuaciones de presentación. La tabla enumera péptidos sobrepresentados muchísimo más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+++), sobrepresentados mucho más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (++), o sobrepresentados más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+). El conjunto de tejidos normales considerados relevantes para la comparación con los tumores consistió en: tejido adiposo, glándula suprarrenal, células sanguíneas, vaso sanguíneo, médula ósea, cerebro, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroidea, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroidea, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

SEQ ID N.°	Secuencia	Presentación del péptido
2	GLLKAYSIRTA	+++
3	YLDEIPPKFSM	+++
6	SIVDFLITA	+++
7	QMFEGQILDV	+++
8	ALSFSSSAGPGLLKA	+++
9	SLVDARFQL	+++
10	GLWHGMFANV	+++

11	AMAELRVVV	++
12	GVALTVTGV	+++
13	FLEEKEQAAL	+++
14	GLAGPVRGV	+++
15	YLAPENGYLMEA	+++
16	ILGPQGNTI	+++
17	RLSQLEGVNV	+
18	SIAAYNPVV	+++
19	SLATTLTKI	+++
20	YLPDSLTQL	+++
21	TLIEDDALNGA	+++
23	YTLSKTEFL	+++
24	SLLGGITVV	++
28	GLIDSLMAYV	+++
30	ILDISRSEV	+++
31	SLFDGIATGL	+++
33	VLFGEITRL	++
34	ALLDEQQVNV	++
35	KLPEPPPLA	+++
36	ALWDEFNQL	+++
37	ILSAILVHL	+++
38	TLTSIIVAV	+++
40	VIADRVVTV	+++
41	FLDDGNQMLL	+++
42	FLIDASQRV	+++
43	FLIESKLLSL	+++
44	GLAQDPKSLQL	+++
45	IIDSSPTAL	+++
46	SLFIGAEIVAV	+++
47	VLMDDTDPL	+++

48	VLMDDTDPLV	+++
49	SLIGGTNFV	++
50	VLANRVAVV	+
51	ALLDKAQINL	++
53	ILVQVIPVV	+++
54	ALNDEINFL	+++
55	KLLETKWTL	+
56	ILLRDLPTL	++
57	GLAHFVNEI	++
58	GLDSSVNVQGSVL	+++
59	WLSTSIPEA	++
60	SLSDVRVIV	++
62	GQLDFSEFL	+
63	LLAGLLVGV	+++
64	GLLSQGSPL	+++
65	IITDLLRSV	+++
66	SLWEENQAL	++
67	FLTPPLLSV	+++
68	TMIVSLAAV	++
69	QIWDKILSV	+
70	KLAEISLGV	+++
73	VLKVFLENV	++
74	LLQEGEVYSA	+
77	KVFGGFQVV	++
80	ILLDTPLFLL	+++
81	SLDKGTLYI	++
82	NLHNSYYSV	+
83	VILDKYYFL	+
84	ALDPASISV	+
87	RLLELLQEA	++

89	YLFPETEFI	+
91	NLDAATYQV	+
92	ALLDEQQVNVLL	+
94	ALADGVPVAL	++
96	KLTNGIWVL	+
97	TVGPGLLGV	++
98	YLIGLDPENLAL	++
99	ALIGDDVGL	++
100	SLQSFIHGV	+
102	GLYEGLDWL	+++
103	GLYSGEVLV	+
104	NAVVELVTV	++
106	ILLDTPLFL	+
107	LULAKLEKV	+++
110	VLFNIDGQGNHV	+++
111	LLDVTPKAV	+++
112	YLDPSLNSL	+++
113	FVFEPPPGV	+++
114	IITKDLFQV	+++
115	SLLDFERSL	+++
116	QLAWFDTDL	+
117	YMLDIFHEVL	+++
118	RLLDFPTLLV	+++
120	IIIPEIQKV	++
121	QLQGYLRSV	++
122	ILEPSLYTV	+++
123	NLAGVYSEV	++
124	QIDGTLSTI	++
125	VLDEGSASV	++
126	SLLRVGWSV	++

129	YLEPKLTQV	++
130	TLTSKLYSL	+
132	YILEGEPGKV	++
133	GLDPLGYEIQL	+
134	IVAPGTFEV	+
135	FLLPLIIVL	+++
136	GLSEPIFQL	+++
137	ALFPHLLQPVL	++
138	YLTNEGIQYL	++
139	LLYPTEITV	+++
140	ALLDGRVQL	++
141	SMFGAGLTV	+
142	FLGENISNFL	+++
143	TLVTGLASV	+
146	YLARIQGFQV	+
147	QMLELITRL	+
149	VLLRVLILL	+

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 para los experimentos de RNASeq se obtuvo de:

Asterand (Detroit, MI, EE.UU y Royston, Herts, Reino Unido); BioCat GmbH (Heidelberg, Alemania); BioServe (Beltsville, MD, EE.UU.); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, EE.UU.); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE.UU.); Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Nápoles, Italia); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE.UU.); y Hospital Universitario de Heidelberg (Heidelberg, Alemania).

El ARN total RNA extraído de los tejidos tumorales para los experimentos de RNASeq se obtuvo de: Asterand (Detroid, MI, EE.UU. & Royston, Herts, Reino Unido); Geneticist

Inc. (Glendale, California, EE.UU.); ProteoGenex Inc. (Culver City, California EE.UU.); y Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido).

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

Experimentos de RNAseq

El análisis de la expresión génica de las muestras de ARN tumorales y de tejido normal fue llevado a cabo mediante secuenciación de última generación (RNAseq) por CeGaT (Tübingen, Alemania). En suma, se prepararon bibliotecas de secuenciación con el kit de reactivos HiSeq v4 de Illumina siguiendo el protocolo del proveedor (Illumina Inc, San Diego, CA, EE.UU.), que incluye la fragmentación del ARN, su conversión en ADNc y la adición de los adaptadores de secuenciación. Las bibliotecas derivadas de múltiples muestras se mezclaron en partes equimolares y se secuenciaron con el secuenciador Illumina HiSeq 2500 siguiendo las instrucciones del fabricante, generando lecturas únicas (*single end reads*) de 50 pb. Las lecturas procesadas se cartografiaron con respecto al genoma humano (GRCh38) con el software STAR. Se ofrecen los datos de expresión a nivel de transcrito en forma de RPKM (lecturas por kilobase por cada millón de lecturas cartografiadas, generadas con el software Cufflinks) y a nivel de exón (lecturas totales, generadas con el software Bedtools), basadas en anotaciones de la base de datos de secuencias ensembl (Ensembl77). Las lecturas de exón están normalizadas para la longitud del exón y el tamaño de alineación para obtener los valores de RPKM. En la Figura 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 cáncer de vejiga urinaria. La Tabla 9 muestra las puntuaciones de expresión de otros genes mostrados a título de ejemplo.

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

valor de referencia (basal) de esta puntuación se calculó con mediciones de los siguientes tejidos normales relevantes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, arteria, células sanguíneas, médula ósea, cerebro, cartílago, colon, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, páncreas, nervio periférico, hipófisis, recto, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroides, tráquea, vejiga urinaria y vena.

En caso de disponer de datos de expresión de varias muestras del mismo tipo de tejido, para el cálculo se usó la media aritmética de todas las muestras pertinentes.

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión del gen
2	GLLKAYSIRTA	+++
3	YLDEIPPKFSM	++
5	IQDPVIFYV	+
6	SIVDFLITA	+
8	ALSFSSSAGPGLLKA	+++
11	AMAELRVVV	+++
18	SIAAYNPVV	+++
21	TLIEDDALNGA	++
22	SIAKEGVVGA	++
34	ALLDEQQVNV	+++
35	KLPEPPPLA	+++
36	ALWDEFNQL	+++
37	ILSAILVHL	+++
38	TLTSIIVAV	+++
40	VIADRVVTV	+
46	SLFIGAEIVAV	+
50	VLANRVAVV	+++
53	ILVQVIPVV	+
54	ALNDEINFL	+++
55	KLLETKWTL	+++
56	ILLRDLPTL	+++

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión del gen
69	QIWDKILSV	+++
76	AVVSSVNTV	++
83	VILDKYYFL	+++
85	HLLDSKVPSV	++
87	RLLELLQEA	+++
89	YLFPETEFI	++
92	ALLDEQQVNVLL	+++
100	SLQSFIHGV	+++
109	RLIDDMVAQA	+
110	VLFNIDGQGNHV	+++
117	YMLDIFHEVL	+++
124	QIDGTLSTI	+
135	FLLPLIIVL	+
139	LLYPTEITV	++
140	ALLDGRVQL	+++
142	FLGENISNFL	+++
149	VLLRVLILL	++

EJEMPLO 3

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

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, los inventores llevaron a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de linfocitos T basado en estimulaciones reiteradas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo los inventores han podido demostrar la inmunogenicidad de algunos TUMAP restringidos 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 10).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

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

Los linfocitos CD8+ y 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, Núremberg, 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 (SEQ ID N.º 206) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID N.º 207), 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 péptidos del cáncer de vejiga urinaria

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

la de los controles negativos correspondientes. En la Figura 4 se muestran a título de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de 3 péptidos de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 25 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 10A. Los resultados adicionales de 26 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 10B.

Tabla 10A: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I de la invención
Resultados a título de ejemplo de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante de los péptidos de la invención.
<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 %= +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID N.°	Secuencia	Pocillos
155	VLSSGLTAA	+
156	KLVEFDFLGA	+
159	SLIEDLILL	+
160	SLLGGNIRL	++
162	TLLAAEFLKQV	+
164	ALADLTGTVV	+
167	SLWGGDVVL	++
168	LTAPPEALLMV	+
170	GLIEIISNA	+
172	LLYGHTVTV	++
173	FVFSFPVSV	++
176	SMSGYDQVL	+
177	NLLQVLEKV	+
178	ALNEEAGRLLL	+
182	YLAPFLRNV	++
184	LMTKEISSV	+
186	VLYPHEPTAV	+
189	ALLRTVVSV	+

SEQ ID N.°	Secuencia	Pocillos
192	ALNPADITV	++
193	ALVQDLAKA	++
198	NLIEKSIYL	+
200	YLNVQVKEL	+
203	FLIPYAIML	+
204	GVYDGEEHSV	+
205	KIVDFSYSV	++

Tabla 10B: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA adicionales de clase I de la invención. Resultados a título de ejemplo de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante de los péptidos restringidos por HLA-A*02 de la invención. Se indican los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro*. El porcentaje de pocillos positivos y de donantes (entre los evaluables) se resumen como se indica <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 %= +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID N:°	Secuencia	Posillos positivos [%]
5	IQDPVIFYV	+++
6	SIVDFLITA	+
9	SLVDARFQL	+
10	GLWHGMFANV	++
14	GLAGPVRGV	+
15	YLAPENGYLMEA	+
16	ILGPQGNTI	+
17	RLSQLEGVNV	+
23	YTLSKTEFL	+
24	SLLGGITVV	++
27	STTNGGILTV	+
29	ALSSPPPTV	+
30	ILDISRSEV	++++
41	FLDDGNQMLL	+
50	VLANRVAVV	++++
53	ILVQVIPVV	++
57	GLAHFVNEI	+
59	WLSTSIPEA	+
60	SLSDVRVIV	+
75	RVISSVISV	++

SEQ ID N:°	Secuencia	Posillos positivos [%]
111	LLDVTPKAV	+++
114	IITKDLFQV	+
126	SLLRVGWSV	++
146	YLARIQGFQV	++
148	TLGVIPESV	+

EJEMPLO 4

Síntesis de péptidos

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

EJEMPLO 5

Ensayos de unión a MHC

Los péptidos candidatos para los tratamientos basados en linfocitos T según la presente invención se analizaron también para comprobar su capacidad de unión a MHC (afinidad). Los complejos individuales de péptido-MHC se produjeron mediante intercambio de UV-ligando, un proceso en el que un péptido sensible a la luz UV se escinde tras ser irradiado con luz UV, y se intercambia con el péptido de interés según el análisis. Sólo los péptidos candidatos que pueden unirse de forma eficaz y estabilizar las moléculas de péptido-MHC receptor impiden la disociación de los complejos de MHC. Para determinar el rendimiento de la reacción de intercambio se llevó a cabo una prueba de ELISA basada en la detección de la cadena ligera (β2m) de los complejos MHC estabilizados. La prueba se realizó como se describe de forma general en Rodenko et al. (Rodenko et al., 2006).

Se recubrieron placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) durante toda la noche con 2 µg/ml de estreptavidina en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4x y se bloquearon

durante 1 h a 37 °C en tampón de bloqueo con BSA al 2%. Los monómeros de HLA-A*02:01/MLA-001 replegados sirvieron como patrones, y cubrían un intervalo de 15-500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC de la reacción de intercambio con UV se diluyeron 100 veces en tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con 2 µg/ml de HRP conjugada con anti-β2m durante 1 h at 37 °C, se lavaron de nuevo y se detectaron con solución de TMB que contenía NH2SO4 para parar la reacción. La absorción se midió a 450 nm. Los péptidos candidatos que presentan un elevado rendimiento de intercambio (preferiblemente superior al 50%, lo más preferible: superior al 75%) son generalmente preferidos para la generación y producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o fragmentos de los mismos, ya que presentan suficiente afinidad por las moléculas de MHC e impiden la disociación de los complejos de MHC.

Tabla 11: Puntuaciones de unión a MHC de clase I. La unión de péptidos restringidos a HLA de clase I a HLA-A*02:01 se clasificó atendiendo al rendimiento del intercambio de péptidos: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; >75% = ++++.

SEQ ID N.°	Secuencia	Intercambio de péptido
2	GLLKAYSIRTA	+++
3	YLDEIPPKFSM	++++
5	IQDPVIFYV	++++
6	SIVDFLITA	+++
7	QMFEGQILDV	+++
8	ALSFSSSAGPGLLKA	+++
9	SLVDARFQL	++++
10	GLWHGMFANV	++++
11	AMAELRVVV	++++
12	GVALTVTGV	++++
13	FLEEKEQAAL	+++

SEQ ID N.°	Secuencia	Intercambio de péptido
14	GLAGPVRGV	+++
15	YLAPENGYLMEA	+++
16	ILGPQGNTI	+++
17	RLSQLEGVNV	+++
18	SIAAYNPVV	++++
19	SLATTLTKI	+++
20	YLPDSLTQL	++++
21	TLIEDDALNGA	+++
23	YTLSKTEFL	++++
24	SLLGGITVV	++++
25	SLDSSGFSL	+++
26	GLALLYSGV	++++
27	STTNGGILTV	+++
28	GLIDSLMAYV	++++
29	ALSSPPPTV	+++
30	ILDISRSEV	+++
31	SLFDGIATGL	++++
32	YQAPDIDVQL	+++
33	VLFGEITRL	+++
34	ALLDEQQVNV	+++
35	KLPEPPPLA	+++
36	ALWDEFNQL	+++
37	ILSAILVHL	+++
38	TLTSIIVAV	+++
39	AMASHLTST	+++

SEQ ID N.°	Secuencia	Intercambio de péptido
40	VIADRVVTV	+++
41	FLDDGNQMLL	++++
42	FLIDASQRV	+++
43	FLIESKLLSL	++++
44	GLAQDPKSLQL	+++
45	IIDSSPTAL	++
47	VLMDDTDPL	+++
48	VLMDDTDPLV	+++
49	SLIGGTNFV	+++
50	VLANRVAVV	+++
52	SLATLEGIQL	+++
53	ILVQVIPVV	+++
54	ALNDEINFL	+++
55	KLLETKWTL	++++
56	ILLRDLPTL	+++
57	GLAHFVNEI	++++
58	GLDSSVNVQGSVL	+++
59	WLSTSIPEA	++++
60	SLSDVRVIV	++++
62	GQLDFSEFL	+++
63	LLAGLLVGV	+++
64	GLLSQGSPL	+++
65	IITDLLRSV	++++
66	SLWEENQAL	+++
67	FLTPPLLSV	++++

SEQ ID N.°	Secuencia	Intercambio de péptido
68	TMIVSLAAV	+++
69	QIWDKILSV	+++
70	KLAEISLGV	++
71	LLSEDFVSV	++
72	SLFTGLRSI	+++
73	VLKVFLENV	++++
74	LLQEGEVYSA	+++
75	RVISSVISV	+++
76	AVVSSVNTV	+++
77	KVFGGFQVV	++++
78	FIPDFAVAI	++++
79	FLDPATPRV	+++
80	ILLDTPLFLL	+++
81	SLDKGTLYI	+++
82	NLHNSYYSV	+++
83	VILDKYYFL	++++
84	ALDPASISV	+++
85	HLLDSKVPSV	+++
86	FLIJLIISV	+++
87	RLLELLQEA	++++
88	ALASLENHV	+++
89	YLFPETEFI	+++
90	GMTELYFQL	+++
91	NLDAATYQV	+++
92	ALLDEQQVNVLL	+++

SEQ ID N.°	Secuencia	Intercambio de péptido
93	LLDLIQTKV	+++
94	ALADGVPVAL	+++
95	YLIGQHVTA	++++
96	KLTNGIWVL	+++
97	TVGPGLLGV	+++
98	YLIGLDPENLAL	+++
99	ALIGDDVGL	+++
100	SLQSFIHGV	+++
101	ILDEMRAQL	+++
102	GLYEGLDWL	+++
103	GLYSGEVLV	++++
105	TLFPSKIGV	+++
106	ILLDTPLFL	+++
107	LULAKLEKV	++
108	YLDPNQRDL	+++
109	RLIDDMVAQA	+++
110	VLFNIDGQGNHV	+++
111	LLDVTPKAV	+++
112	YLDPSLNSL	+++
113	FVFEPPPGV	++++
114	IITKDLFQV	+++
115	SLLDFERSL	+++
116	QLAWFDTDL	+++
117	YMLDIFHEVL	+++
118	RLLDFPTLLV	+++

SEQ ID N.°	Secuencia	Intercambio de péptido
120	IIIPEIQKV	+++
121	QLQGYLRSV	+++
122	ILEPSLYTV	++++
123	NLAGVYSEV	++++
124	QIDGTLSTI	+++
126	SLLRVGWSV	++++
127	KLNATNIEL	+++
128	KLWGQSIQL	++++
129	YLEPKLTQV	+++
130	TLTSKLYSL	++++
131	ILTSIQSLL	++++
132	YILEGEPGKV	++++
133	GLDPLGYEIQL	++++
134	IVAPGTFEV	+++
135	FLLPLIIVL	+++
136	GLSEPIFQL	+++
137	ALFPHLLQPVL	++++
138	YLTNEGIQYL	+++
139	LLYPTEITV	+++
140	ALLDGRVQL	++++
141	SMFGAGLTV	++++
142	FLGENISNFL	+++
143	TLVTGLASV	+++
144	YLAGEAPTL	+++
145	ALYPGQLVQL	+++

SEQ ID N.°	Secuencia	Intercambio de péptido
146	YLARIQGFQV	++++
147	QMLELITRL	+++
148	TLGVIPESV	++++

Referencias bibliográficas

Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933

American Cancer Society, (2015), www.cancer.org

Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902

Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814

Arafat, H. et al., Surgery **150** (2011): 306-315

Azevedo, R. et al., J Control Release **214** (2015): 40-61

Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274

Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282

Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109

Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300

Bidkhori, G. et al., PLoS.One. **8** (2013): e67552

Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003): 707-711

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

Brody, J. R. et al., Cancer Biol Ther. (2016): 0

Brossart, P. et al., Blood **90** (1997): 1594-1599

Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004): 29-43

Cahill, D. P. et al., CNS.Oncol **4** (2015): 287-294

Card, K. F. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 345-357

Chang, W. et al., Int.J Cancer **125** (2009): 2844-2853

Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. **65** (2004): 1211-1223

Cohen, C. J. et al., J Mol.Recognit. **16** (2003a): 324-332

Cohen, C. J. et al., J Immunol. **170** (2003b): 4349-4361

Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114

Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)

Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738

Daugaard, I. et al., Sci.Rep. **6** (2016): 35807

Davis, J. E. et al., Oncotarget. (2016)

Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170

Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003): 2197-2207

Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296

Follenzi, A. et al., Nat Genet. **25** (2000): 217-222

Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814

Fuge, O. et al., Res Rep.Urol. **7** (2015): 65-79

Gabrilovich, D. I. et al., Nat.Med **2** (1996): 1096-1103

Gandhi, A. V. et al., Ann Surg.Oncol **20 Suppl 3** (2013): S636-S643

Gardina, P. J. et al., BMC.Genomics **7** (2006): 325

Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. **6** (2006): 383-393

Georgiou, G. K. et al., World J Surg.Oncol **11** (2013): 213

Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867

Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997): 905-911

Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual **4th** (2012)

Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual **2nd** (2014)

Grivas, P. D. et al., Semin.Cancer Biol **35** (2015): 125-132

Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353

Harris, T. M. et al., Arch.Pathol.Lab Med. **139** (2015): 494-507

Huang, Q. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **101** (2004): 3456-3461

Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838

Jang, S. Y. et al., Cancer Lett. **314** (2012): 185-197

Jones, R. T. et al., Urol.Clin North Am. **43** (2016): 77-86

Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615

Kang, C. Y. et al., J Gastrointest.Surg. **18** (2014): 7-15

Kaz, A. M. et al., Genes Chromosomes.Cancer **51** (2012): 384-393

Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)

Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015a): 312-330

Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015b): 312-330

Krieg, A. M., Nat.Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484

Kuball, J. et al., Blood **109** (2007): 2331-2338

Leivo, I. et al., Cancer Genet.Cytogenet. **156** (2005): 104-113

Li, Y. et al., Mol.Biol Rep. **40** (2013): 4543-4551

Liddy, N. et al., Nat.Med. **18** (2012): 980-987

Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med **162** (1985): 1745-1759

Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291

Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585

Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795

Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)

Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237

Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129

Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027

Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443

Mostafa, W. Z. et al., J Cutan.Pathol. **37** (2010): 68-74

Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res. **7** (2008): 51-61

Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480

Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638

National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov

Oeda, S. et al., Int.J Dev.Biol **57** (2013): 383-389

Otani, K. et al., J Pathol. **234** (2014): 302-315

Papagerakis, S. et al., Hum.Pathol. **34** (2003): 565-572

Persson, F. et al., Cancer Lett. **260** (2008): 37-47

Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (http://CRAN.R-project.org/packe=nlme) (2015)

Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787

Porta, C. et al., Virology **202** (1994): 949-955

Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219

Rauch, T. A. et al., Tumour.Biol **33** (2012): 287-296

Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006): 67-74

Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921

Rodenko, B. et al., Nat.Protoc. **1** (2006): 1120-1132

Rouanne, M. et al., Crit Rev Oncol Hematol. **98** (2016): 106-115

Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491

Sanchez-Palencia, A. et al., Int.J Cancer **129** (2011): 355-364

Schlienger, S. et al., Mol.Biol Cell **25** (2014): 17-29

Schlienger, S. et al., Oncotarget. **7** (2016): 15811-15827

Schmitt, T. M. et al., Hum.Gene Ther. **20** (2009): 1240-1248

Schmitt-Graeff, A. et al., Histopathology **51** (2007): 87-97

Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. **119** (2006): 135-145

Scotto, L. et al., Genes Chromosomes.Cancer **47** (2008): 755-765

Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576

SEER Stat facts, (2014), http://seer.cancer.gov/

Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)

Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell **3** (2003): 377-386

Shi, J. et al., Xi.Bao.Yu Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za Zhi. **32** (2016): 360-363

Simonova, O. A. et al., Mol.Biol (Mosk) **49** (2015): 667-677

Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195

Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094

Smith, M. J. et al., Br.J Cancer **100** (2009): 1452-1464

So, P. L. et al., Mech.Dev. **84** (1999): 157-160

Sobolik-Delmaire, T. et al., Cell Commun.Adhes. **14** (2007): 99-109

Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016a)

Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016b)

Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163

Tan, X. et al., Exp.Ther.Med **1** (2010): 211-216

Teufel, R. et al., Cell Mol.Life Sci. **62** (2005): 1755-1762

Thorsen, K. et al., Mol.Cell Proteomics. **7** (2008): 1214-1224

Tokar, E. J. et al., Chem Res Toxicol. **26** (2013): 96-105

Tran, E. et al., Science **344** (2014): 641-645

Unger, K. et al., Endocr.Relat Cancer **17** (2010): 87-98

von Rundstedt, F. C. et al., Transl.Androl Urol. **4** (2015): 244-253

Walter, S. et al., J.Immunol. **171** (2003): 4974-4978

Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261

Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423

Xie, X. et al., Oncol Lett. **7** (2014): 1537-1543

Yang, C. et al., Tumour.Biol (2015)

Yang, S. et al., Biochim.Biophys.Acta **1772** (2007): 1033-1040

Yu, J. et al., Gut **64** (2015): 636-645

Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577

Zhang, H. et al., Cancer Genet. **208** (2015a): 482-491

Zhang, X. Q. et al., J Neurooncol. **125** (2015b): 253-263

Zhang, Z. et al., Hum.Mol.Genet. **20** (2011): 4167-4174

Zufferey, R. et al., J Virol. **73** (1999): 2886-2892