I32943WO-A

Péptidos y combinaciones de péptidos para inmunoterapia contra el linfoma no hodgkiniano (LNH) 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

Los linfomas no hodgkinianos (LNH) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades linfoproliferativas. Los LNH surgen normalmente en los tejidos linfáticos y se pueden diseminar a otros órganos (National Cancer Institute, 2015).

El LNH es el séptimo tipo más frecuente de cáncer y representa el 4,3% de los nuevos casos de cáncer en EE.UU. (SEER Stat facts, 2014). Es la neoplasia maligna hematológica más frecuente en Europa y en EE.UU.(Inoges et al., 2014).

La probabilidad de contraer un LNH aumenta con la edad: La mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 66 años. El LNH es más frecuente en las personas de ascendencia caucásica (21 casos por cada 100.000 personas), seguida de la africana (15 casos por cada 100.000 personas) y asiática (14 casos por cada 100.000 personas). Los varones tienen un riesgo más alto de contraerlo que las mujeres (23,9 casos por cada 100.000 varones frente a 16,3 casos por cada 100.000 mujeres) (SEER Stat facts, 2014).

La supervivencia relativa a 5 años de los pacientes con LNH es del 70% y varía en función del estadio tumoral en el momento del diagnóstico. En la enfermedad localizada, la supervivencia relativa a los 5 años es del 82%. Si el LNH se ha diseminado a otras partes del cuerpo, la supervivencia relativa a los 5 años desciende al 73,8% en la enfermedad regional y al 62,4% en el estadio metastásico (SEER Stat facts, 2014).

Los factores de riesgo consisten en la edad (avanzada), el sexo masculino, la etnia (caucásica), la exposición al benceno o a la radiación, el VIH, las enfermedades autoinmunitarias, las infecciones por HTLV-1, EBV o HHV8, las infecciones por *Helicobacter pylori*, *Chlamydophila psittaci*, *Campylobacter jejuni* o por el CHV, el peso corporal (alto) y los implantes mamarios (American Cancer Society, 2015).

El LNH se divide en más de 60 subtipos. Los tres subtipos más frecuentes son el linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés, el subtipo más común), el linfoma folicular (LF, el segundo más común) y el linfoma linfocítico pequeño/linfoma linfocítico crónico (LLP/LLC, el tercer subtipo más común). El DLBCL, el LF y el LLP/LLC suponen cerca del 85% de los LNH (Li et al., 2015).

El linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) es el tipo más común de LNH y comprende el 30% de todos los casos de LNH. El DLBCL pertenece a los subtipos de alto grado del LHN, por lo que la mayoría de los pacientes presenta una enfermedad que progresa con rapidez.
El Índice pronóstico internacional (IPI) para el LNH de alto grado usa cinco factores de riesgo significativos para pronosticar la supervivencia global:
1. Edad (≤60 años o >60 años)
2. Lactato deshidrogenasa (LDH) en suero (normal o elevada)
3. Estado general de salud (*Performance Status*) (0 o 1 frente a 2 a 4)
4. Estadio (estadio I o II frente a estadio III o IV)
5. Afectación extraganglionar (0 o 1 frente a 2 a 4)

Los pacientes con dos o más factores de riesgo presentan una probabilidad inferior al 50% de gozar de supervivencia sin recidiva y de sobrevivir (SG) a los 5 años. Los pacientes con reorganizaciones de los genes bcl-2 y myc y/o la sobreexpresión de myc presentan un pronóstico especialmente malo. Los pacientes con DLBCL que expresan conjuntamente CD20 y CD30 presentan un pronóstico más favorable y están predestinados a un tratamiento específico anti-CD30 (National Cancer Institute, 2015).

El linfoma folicular (LF) es el segundo tipo más común de LNH y comprende el 20% de todos los casos de LNH y el 70% de todos los linfomas de bajo grado (indolentes). Más del 90% de los pacientes presentan reorganización del gen bcl-2. La mayoría de los pacientes tiene más de 50 años en el momento del diagnóstico y presenta un estadio avanzado de la enfermedad.

El Índice pronóstico internacional para el linfoma folicular (FLIPI) usa cinco factores de riesgo significativos para pronosticar la supervivencia global:

1. Edad (≤60 años o >60 años)
2. Lactato deshidrogenasa (LDH) en suero (normal o elevada)
3. Estadio (estadio I o II frente a estadio III o IV)

4. Nivel de hemoglobina (≥120 g/l o <120 g/l)
5. Número de áreas ganglionares (≤4 o >4).

Los pacientes con uno o ningún factor de riesgo presentan un índice de supervivencia a 10 años del 85%. Los pacientes con tres o más factores de riesgo presentan un índice de supervivencia a 10 años del 40% (National Cancer Institute, 2015).

El diagnóstico del LNH se efectúa con una biopsia por excisión de un ganglio linfático anómalo o una biopsia por incisión de un órgano afectado. Aparte de las técnicas de inmunohistoquímica, también se emplean técnicas de citogenética, genética molecular e hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para esclarecer el diagnóstico (Armitage, 2007).

La estadificación se efectúa una vez evaluados los antecedentes del paciente y practicada una exploración física y un estudio analítico que incluya parámetros hematológicos, cribado bioquímico y, sobre todo, el análisis del nivel de lactato-deshidrogenasa (LDH) en suero. Las pruebas de diagnóstico por la imagen consisten en tomografías computadorizadas de tórax, abdomen y pelvis y en TEP (Armitage, 2007).

El pronóstico y el tratamiento dependerán de la diferenciación entre los tipos de bajo grado (indolentes) y alto grado (agresivos) del LNH. Los LNH de bajo grado progresan con lentitud, tienen un buen pronóstico y cuando se hallan en los estadios iniciales responden a la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia, si bien no tienen cura en los estadios avanzados. Los LNH de alto grado progresan con rapidez, pero responden a la quimioterapia combinada intensiva (National Cancer Institute, 2015).

Según el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico a los pacientes se los clasifica en diversos grupos de pronóstico (National Cancer Institute, 2015), tal y como figura a continuación:

Estadio	Grupos de pronóstico

I	Afectación de un único sitio linfático (región ganglionar, anillo de Waldeyer, timo o bazo (I).
	Afectación localizada en un solo órgano o sitio extralinfático sin ninguna afectación ganglionar (IE).
II	Afectación de dos o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II).
	Afectación localizada de un solo órgano o sitio extralinfático acompañada de afectación ganglionar regional con o sin afectación de otras regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (IIE). El número de regiones afectadas se puede indicar con un número arábigo en subíndice (ejemplo: II_3).
III	Afectación de regiones ganglionares situadas en ambos lados del diafragma (III), que pueden estar acompañadas de diseminación extralinfática junto con afectación de ganglios adyacentes (IIIE) o con afectación del bazo (IIIS) o ambos (IIIE, IIIS).
IV	Afectación difusa o diseminada de uno o más órganos extralinfáticos, junto con afectación ganglionar asociada o sin ella.
	Afectación de un órgano extralinfático aislado sin afectación de ganglios regionales adyacentes, pero sí presencia de metástasis a distancia. El estadio IV incluye cualquier afectación del hígado o de la médula ósea, los pulmones (otros puntos aparte de la extensión directa desde otro sitio) o del líquido cefalorraquídeo.

En los pacientes con LNH se usa normalmente el sistema de estadificación de Ann Arbor. En este sistema, los estadios I, II, III y IV se subdividen en las categorías A y B. Los pacientes con síntomas generalizados bien definidos son encuadrados en la categoría B, mientras que los carentes de tales síntomas pertenecen a la A. Los síntomas de la categoría B incluyen la pérdida inexplicada de más del 10% del peso corporal en los seis meses previos al diagnóstico, fiebre inexplicada con temperatura superior a 38 ºC y sudoración nocturna profusa.

Las denominaciones especializadas indican la afectación de órganos o sitios específicos (National Cancer Institute, 2015), tal y como figura a continuación:

Denominación	Sitios específicos
E	Neoplasias malignas linfáticas extraganglionares pero cercanas a conglomerados linfáticos importantes
N	Ganglios
H	Hígado
L	Pulmón
M	Médula ósea
S	Bazo
P	Pleura
O	Hueso
D	Piel

Para asignar el estadio preciso, los pacientes reciben un estadio clínico (CS) según los hallazgos de la evaluación clínica y otro estadio patológico (PS) basado en los hallazgos de los procedimientos invasivos aparte de la biopsia inicial (National Cancer Institute, 2015).

El tratamiento del linfoma no hodgkiniano (LNH) depende del tipo histológico y del estadio. Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen (National Cancer Institute, 2015):

Estadio	Opciones de tratamiento estándar:
LNH de bajo grado, en estadio I o en estadio II contiguo	Radioterapia
	Rituximab ± quimioterapia
	Vigilancia atenta
	Otros tratamientos como los indicados para los pacientes con enfermedad avanzada
LNH de bajo grado, no contiguo en estadio II, III o IV	Vigilancia atenta en los pacientes asintomáticos
	Rituximab
	Análogos del nucleósido purina

	Alquilantes ± corticoesteroides
	Quimioterapia de combinación
	Ibritumomab tiuxetan marcado con itrio 90
	Rituximab de mantenimiento
LNH de bajo grado, recidivante	Quimioterapia (en monoterapia o combinación)
	Rituximab
	Lenalidomida
	Anticuerpos monoclonales anti-CD20 radiomarcados
	Radioterapia paliativa
LNH de alto grado, en estadio I o en estadio II contiguo	R-CHOP ± (radioterapia en campo afecto) IF-XRT
LNH de alto grado, no contiguo en estadio II, III o IV	R-CHOP
	Otra quimioterapia de combinación
Linfoma linfoblástico	Tratamiento intensivo
	Radioterapia
Linfoma difuso de células pequeñas no hendidas o linfoma de Burkitt	Poliquimioterapia intensiva
	Profilaxis meníngea (del SNC)
LNH de alto grado, recidivante	Trasplante de médula o de células madre
	Retratamiento con agentes estándar
	Radioterapia paliativa

LNH de bajo grado, en estadio I o estadio II contiguo:

Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen la radioterapia, el rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20) ± quimioterapia, vigilancia atenta y otros tratamientos como los asignados a los pacientes con enfermedad avanzada.

LNH de bajo grado, no contiguo en estadio II, III o IV:

Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen la vigilancia atenta en los pacientes asintomáticos, rituximab, obinutuzumab (anticuerpo monoclonal anti-CD20), análogos del nucleósido purina (fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina), alquilantes (ciclofosfamida, clorambucilo) ± corticoesteroides, bendamustina, quimioterapia de

combinación (CVP, C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazina y prednisona), CHOP, FND (fludarabina, mitoxantrona ± dexametasona), ibritumomab tiuxetan marcado con itrio y rituximab de mantenimiento. El rituximab (R) se considera tratamiento de primera línea, solo o combinado con otros fármacos (R-bendamustina, R-F (fludarabina), R-CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), R-CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona), R-FM (fludarabina y mitoxantrona), R-FCM (fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona). En curso de evaluación clínica se hallan los trasplantes de médula ósea y de células madre de sangre periférica, las vacunas idiotípicas y los anticuerpos monoclonales radiomarcados (ofatumumab: anticuerpo monoclonal anti-CD20).

LNH de bajo grado, recidivante:
Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen la quimioterapia (monoterapia o combinación), rituximab, lenalidomida, anticuerpos monoclonales anti-CD20 radiomarcados (ibritumomab con itrio 90) y radioterapia paliativa. Las opciones de tratamiento en curso de evaluación clínica incluyen los trasplantes de células madre.

LNH de alto grado, en estadio I o en estadio II contiguo:
Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen R-CHOP ± IF-XRT. Las opciones de tratamiento en curso de evaluación clínica incluyen R-ACVBP (rituximab + doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina y prednisona).

LNH de alto grado, no contiguo en estadio II, III o IV:
Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen la quimioterapia de combinación ± radioterapia dirigida a campo local. Las combinaciones farmacológicas consisten en ACVBP, CHOP, CNOP (ciclofosfamida, mitoxantrona, vincristina y prednisona), m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona y leucovorina), MACOP-B (metotrexato, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona en dosis fija, bleomicina y leucovorina), ProMACECytaBOM (prednisona, doxorrubicina, ciclofosfamida, etopósido, citarrabina, bleomicina,

vincristina, metotrexato y leucovorina), y R-CHOP. En curso de evaluación clínica se hallan el trasplante medular y el trasplante de células madre.

Linfoma linfoblástico:
Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen el tratamiento intensivo y la radioterapia.
Linfoma difuso de células pequeñas no hendidas o de Burkitt:
Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen la poliquimioterapia intensiva y la profilaxis meníngea (SNC).

LNH de alto grado, recidivante:
Las opciones de tratamiento ordinarias incluyen el trasplante de médula ósea o el de células madre, retratamiento con fármacos ordinarios (rituximab, anticuerpos monoclonales anti-CD20 radiomarcados), denileukin diftitox (proteína de fusión que combina la toxina diftérica con la interleucina 2) y radioterapia paliativa. Las opciones de tratamiento en curso de evaluación clínica incluyen el trasplante de células madre (National Cancer Institute, 2015).

En los pacientes con linfoma se observa en ocasiones la regresión espontánea del tumor. Por consiguiente, la inmunoterapia activa es una opción de tratamiento (Palomba, 2012).

Una opción de vacunación importante la constituyen las vacunas anti-idiotípicas. Los linfocitos B expresan en su superficie inmunoglobulinas provistas de una secuencia específica de aminoácidos en las regiones variables de sus cadenas pesadas y ligeras, que son únicas de cada clon celular (= idiotipo, Id). El idiotipo actúa como un antígeno asociado a tumor.

La inmunización pasiva incluye la inyección de anticuerpos monoclonales anti-Id recombinantes de ratón, bien en monoterapia bien en combinación con IFN-alfa, IL-2 o clorambucilo.

La inmunización activa incluye la inyección de la proteína recombinante (Id) conjugada con un adyuvante (KLH), administrada conjuntamente con el GM-CSF como adyuvante inmunitario. El Id específico de tumor es producido mediante cultivos de hibridomas o técnicas de ADN recombinante (plásmidos) en cultivos de células bacterianas, de insecto o de mamífero.

Se han efectuado tres ensayos clínicos de fase III (Biovest, Genitope, Favrille). En dos de ellos los pacientes han recibido rituximab. En los tres se ha administrado GM-CSF. Biovest emplea una proteína sintetizada con hibridomas, y Genitope y Favrille una proteína recombinante. En los tres ensayos el Id se ha conjugado con KLH. Solo Biovest se ha saldado con un resultado significativo.

Entre las vacunas no idiotípicas se hallan las de los antígenos de cáncer-testículo MAGE, NY-ESO1 y PASD-1, el antígeno de linfocitos B CD20 o las vacunas a base de células. Las vacunas consisten en células dendríticas (CD) estimuladas con células tumorales en apoptosis, lisado de células tumorales, fusión de CD y célula tumoral o CD estimuladas con ARN procedente del tumor.

La vacunación *in situ* implica la vacunación con CpG intratumorales combinada con células tumorales irradiadas o tratadas con quimioterapia cultivadas en presencia del GM-CSF y la recolección, expansión y reinfusión de los linfocitos T.

La vacunación con anticuerpos que alteran los puntos de control inmunitarios comprende anti-CD40, anti-OX40, anti-41BB, anti-CD27, anti-GITR (anticuerpos agonistas que potencian directamente la respuesta antitumoral) o anti-PD1, anti-CTLA-4 (anticuerpos bloqueantes que inhiben el punto de control que dificultaría la respuesta inmunitaria). Ejemplos de ello son el ipilimumab (anti-CTLA-4) y el CT-011 (anti-PD1) (Palomba, 2012).

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 linfoma no hodgkiniano (LNH). Existe asimismo la necesidad de descubrir factores que puedan servir como biomarcadores del cáncer en general y del LNH 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 de la invención pueden actuar como epítopos activos para las MHC de clase II.

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

principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

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

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células inmunitarias, la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Pero Dengjel y cols. descubrieron varios 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 acuerdo con la SEQ ID N.º 146 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 146, 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 146 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 146, 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 a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 146. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 112, de la SEQ ID N.º 114 a la SEQ ID N.º 119, de la SEQ ID N.º 121 a la SEQ ID N.º 145, de la SEQ ID N.º 147 a SEQ ID N.º 202, o de la SEQ ID N.º 204 a la SEQ ID N.º 311 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 en grandes listados resultantes del cribado genético ultrarrápido con elevadas tasas de error o son el resultado del cálculo con algoritmos, pero no habían sido vinculados en absoluto con el cáncer hasta ahora. Los péptidos de la Tabla 3 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos de la invención. Los péptidos de las Tablas 4A y B son además útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de otros tipos de neoplasias malignas en las que interviene una sobreexpresión o una presentación en exceso del respectivo polipéptido originario.

Tabla 1: Péptidos conformes a la presente invención.

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
1	LLSGQLPTI	84969	TOX2
2	LLSEETPSA	10765	KDM5B
3	LTIDTQYYL	5422	POLA1
4	TLLGFFLAKV	5422	POLA1
5	VLQGLTFTL	6890	TAP1
6	TLITLPLLFL	6890	TAP1
7	NLLGMIFSM	51398	WDR83OS
8	ALYAVIEKA	5293	PIK3CD
9	FLLDLDPLL	7915	ALDH5A1
10	FLLVGTQIDL	643751,998	CDC42P6, CDC42
11	GLDTVVALL	23203	PMPCA
12	GLLLLVPLL	145864	HAPLN3
13	HLVPASWKL	3718	JAK3
14	LLSDPTPGA	3718	JAK3
15	IIIEDLLEA	10985	GCN1L1
16	TLIAAILYL	5355	PLP2
17	VIIPLLSSV	91526	ANKRD44
18	KLTDQPPLV	91526	ANKRD44
19	VLEAILPLV	2889	RAPGEF1
20	YLIAGGDRWL	2646	GCKR
21	ALFKEAYSL	55732	C1orf112
22	ALKKHLTSV	10773	ZBTB6
23	ALVEDIINL	92399	MRRF
24	AVLGFSFRL	80222	TARS2
25	FLDTSNQHLL	4064	CD180
26	FLGSFIDHV	91147	TMEM67
27	FLNQESFDL	6610	SMPD2
28	FLSNANPSL	7818	DAP3
29	ILSDVTQGL	55591	VEZT
30	ILSTLDVEL	10744,9232	PTTG2, PTTG1
31	KLYDEESLL	57680	CHD8
32	VLNEDELPSV	57680	CHD8
33	LLANIVPIAMLV	4539,6775071, 8923201	MT-ND4L
34	LLWEDGVTEA	22916	NCBP2
35	SLSSERYYL	8320	EOMES
36	VILDIPLLFET	79877	DCAKD
37	VLGNALEGV	4678	NASP

38	YLTAEILELAGN	221613,3012,3013,3014,317772,55766,723790,8329,8330,8331,8332,8334,8335,8336,8337,8338,85235,8969,92815,9555	HIST1H2AA, HIST1H2AE, HIST1H2AD, H2AFX, HIST2H2AB, H2AFJ, HIST2H2AA4, HIST1H2AI, HIST1H2AK, HIST1H2AJ, HIST1H2AL, HIST1H2AC, HIST1H2AB, HIST1H2AM, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HIST1H2AH, HIST1H2AG, HIST3H2A, H2AFY
39	QLLPQGIVPAL	55374	TMCO6
40	FLNSVIVDL	6249	CLIP1
41	ILASIFETV	6574	SLC20A1
42	YLQDLVERA	10347	ABCA7
43	ALLEGVKNV	84678	KDM2B
44	FIIEEQSFL	10200	MPHOSPH6
45	FILDDSALYL	23130	ATG2A
46	FLVEEIFQT	8888	MCM3AP
47	GLLPKLTAL	22920	KIFAP3
48	KILDEDLYI	641	BLM
49	TILGDPQILL	23460	ABCA6
50	LLLDGLIYL	23460	ABCA6
51	SLLGNSPVL	23460	ABCA6
52	VLLEDVDAAFL	617	BCS1L
53	FLREYFERL	5573	PRKAR1A
54	DIFDAMFSV	5573	PRKAR1A
55	ILVEVDLVQA	4261	CIITA
56	GLQDLLFSL	4261	CIITA
57	LQIGDFVSV	51167	CYB5R4
58	QLAPFLPQL	23392	KIAA0368
59	RLHREVAQV	2802	GOLGA3
60	SLLIDVITV	51534	VTA1
61	SLLNKDLSL	1786	DNMT1
62	ALAPYLDLL	54093	SETD4
63	ALIEEAYGL	3836,3841	KPNA1, KPNA5
64	FLVEVSNDV	23224	SYNE2
65	NLTDVSPDL	23224	SYNE2
66	KLAPIPVEL	153241	CEP120
67	LLATVNVAL	23511	NUP188
68	QIAAFLFTV	56006	SMG9
69	TLLAFPLLL	84720	PIGO
70	VLIEILQKA	23633,3841	KPNA6, KPNA5

71	VLLDYVGNVQL	51676	ASB2
72	TLQEETAVYL	51676	ASB2
73	YLGEEYPEV	23451	SF3B1
74	SLDLRPLEV	43	ACHE
75	AALKYIPSV	1794	DOCK2
76	ALADLVPVDVVV	84188	FAR1
77	ALLDVSNNYGI	115752	DIS3L
78	AMEEAVAQV	22897	CEP164
79	AMKEEKEQL	9126	SMC3
80	YLFDEIDQA	9126	SMC3
81	FIFSYITAV	128338	DRAM2
82	FLIDGSSSV	1690	COCH
83	FLMDDNMSNTL	4603	MYBL1
84	FLQELQLEHA	8604	SLC25A12
85	GLAPAEVVVATVA	57591	MKL1
86	GLATIRAYL	2731	GLDC
87	GLFARIIMI	5250	SLC25A3
88	GLFDNRSGLPEA	79733	E2F8
89	GLTALHVAV	602	BCL3
90	HLDEVFLEL	55744	COA1
91	HLSSTTAQV	201633	TIGIT
92	KLLFEIASA	124460	SNX20
93	KLLGSLQLL	81603	TRIM8
94	LLAGQATTAYF	972	CD74
95	LLFDLIPVVSV	284114	TMEM102
96	LLLNENESLFL	26156	RSL1D1
97	LLNFSPGNL	3929	LBP
98	MLQDGIARL	79697	C14orf169
99	QLYDGATALFL	147463	ANKRD29
100	RLIRTIAAI	140461	ASB8
101	SLDQSTWNV	23240	KIAA0922
102	SLFAAISGMIL	931	MS4A1
103	SLQDHLEKV	1756	DMD
104	VLLGLPLLV	9674	KIAA0040
105	VLTPVILQV	100499483,100499484	C9orf174
106	VLYELLQYI	51513	ETV7
107	VQAVSIPEV	55755	CDK5RAP2
108	YLAPENGYLM	6625	SNRNP70
109	YLFQFSAAL	130367	SGPP2
110	YQYPFVLGL	130367	SGPP2

111	YLLDTLLSL	57448	BIRC6
112	FLAILPEEV	7762	ZNF215
114	GLSDISPST	26005	C2CD3
115	LLIDIIHFL	25914	RTTN
116	SLLDNLLTI	25914	RTTN
117	VLATILAQL	26271	FBXO5
118	VLDGMIYAI	54813	KLHL28
119	ELCDIILRV	54813	KLHL28
121	YLTGYNFTL	9521	EEF1E1
122	AISEAQESV	79882	ZC3H14
123	ALLSAFVQL	8295	TRRAP
124	FLGVVVPTV	56996	SLC12A9
125	FVAPPTAAV	162	AP1B1
126	GLSIFIYRL	10075	HUWE1
127	HLMEENMIVYV	65220	NADK
128	KLFDASPTFFA	3992,3995	FADS1, FADS3
129	SLFEASQQL	23347	SMCHD1
130	VIFSYVLGV	79004	CUEDC2
131	VLIEETDQL	6924	TCEB3
132	VLQDQVDEL	51199	NIN
133	ALEELTGFREL	4288	MKI67
134	ALGRLGILSV	22828,26230	SCAF8, TIAM2
135	ALTGLQFQL	22797	TFEC
136	FIFGIVHLL	64066	MMP27
137	FIQQERFFL	4012	LNPEP
138	NLINNIFEL	4012	LNPEP
139	FLASPLVAI	3593	IL12B
140	FLFEDFVEV	140775	SMCR8
141	FLGELTLQL	257218	SHPRH
142	FLYEDSKSVRL	696	BTN1A1
143	TLHAVDVTL	696	BTN1A1
144	GLITQVDKL	9183	ZW10
145	GLLHEVVSL	163486	DENND1B
146	GLLQQPPAL	1871	E2F3
147	GLSEYQRNFL	56890	MDM1
148	ICAGHVPGV	79019	CENPM
149	ILNPVTTKL	81691	LOC81691
150	ILSEKEYKL	127254	C1orf173
151	ILVKQSPML	940	CD28
152	KIMYTLVSV	3709	ITPR2
153	KLLKGIYAI	1235	CCR6

154	KLMNIQQQL	11214	AKAP13
155	KLMTSLVKV	10734	STAG3
156	KMLEDDLKL	2334	AFF2
157	KVLEFLAKV	139422,4113,4115	MAGEB10, MAGEB2, MAGEB4
158	KVQDVLHQV	83756	TAS1R3
159	LLLSDSGFYL	28557	TRBV30
160	LLPPPSPAA	83881	MIXL1
161	NLMLELETV	1063	CENPF
162	RLADLKVSI	2175	FANCA
163	SIFDAVLKGV	157680	VPS13B
164	SLFDGAVISTV	23049	SMG1
165	KLLEEIEFL	23049	SMG1
166	SLFSEVASL	22832	KIAA1009
167	SLFSITKSV	60468	BACH2
168	SLLSPLLSV	54949	SDHAF2
169	SSLEENLLHQV	80205	CHD9
170	STIELSENSL	55635	DEPDC1
171	TLLDVISAL	27340	UTP20
172	TLQDSLEFI	51735,96459	RAPGEF6, FNIP1
173	VILDSVASV	5890	RAD51B
174	VLVEITDVDFAA	79801	SHCBP1
175	VMESILLRL	342850	ANKRD62
176	YLHIYESQL	29851	ICOS
177	YLYEAEEATTL	22798	LAMB4
178	YVLQGEFFL	84541	KBTBD8
179	FVDTNLYFL	81037	CLPTM1L
180	GILQLVESV	6050	RNH1
181	LLFDQNDKV	100653071,10491	CRTAP
182	LLPPPPPVA	23091,4784	ZC3H13, NFIX
183	VLFETVLTI	8906	AP1G2
184	AVLGTSWQL	23041	MON2
185	FIAQLNNVEL	6509	SLC1A4
186	FLDVSRDFV	54461	FBXW5
187	FLNSFVFKM	89910	UBE3B
188	GLEDEMYEV	285905,644619,92105	INTS4L1, INTS4L2, INTS4
189	SLSHLVPAL	285905,644619,92105	INTS4L1, INTS4L2, INTS4
190	GLIELVDQL	90410	IFT20
191	GLSDISAQV	5989	RFX1

192	GMAAEVPKV	348378	FAM159A
193	SLADSMPSL	8945	BTRC
194	SLAPFDREPFTL	3937	LCP2
195	ALIPDLNQI	51361	HOOK1
196	TLALAMIYL	100134301,285074,64682,730268	ANAPC1
197	YLLTDNVVKL	79810	PTCD2
198	GLLSAVSSV	9894	TELO2
199	SLNSTTWKV	1233	CCR4
200	YLLDFEDRL	23207	PLEKHM2
201	YLNISQVNV	9262	STK17B
202	ALAAGGYDV	3009	HIST1H1B
204	RLCDIVVNV	84614	ZBTB37
205	TLFYESPHL	221908	PPP1R35
206	SAVSGQWEV	2326	FMO1
207	GLVGLLEQA	57572,81704,85440	DOCK6, DOCK8, DOCK7
208	FLAVSLPLL	3071	NCKAP1L
209	FLLDTISGL	84864	MINA
210	FLAEQFEFL	55610	CCDC132
211	FIDDLFAFV	1209	CLPTM1
212	FLIGQGAHV	4659	PPP1R12A
213	YINEDEYEV	7874	USP7
214	FLFDGSMSL	3683	ITGAL
215	QLFEEEIEL	63906	GPATCH3
216	KVVSNLPAI	10199	MPHOSPH10
217	AQFGAVLEV	55131	RBM28
218	ALDQFLEGI	57169	ZNFX1
219	ALLELENSV	715,83481	C1R, EPPK1
220	FLAEAPTAL	9814	SFI1
221	FLAPDNSLLLA	22898	DENND3
222	FLIETGTLL	79705	LRRK1
223	FLQDIPDGLFL	206426,266971,8394	PIP5K1P1, PIPSL, PIP5K1A
224	FLSPLLPLL	10961	ERP29
225	GTYQDVGSLNIGDV	973	CD79A
226	GVIDPVPEV	8879	SGPL1
227	IIAEGIPEA	47	ACLY
228	IIAEYLSYV	51667	NUB1
229	ILSPWGAEV	142	PARP1
230	IMDDDSYGV	9874	TLK1

231	IVMGAIPSV	1902	LPAR1
232	KVMEGTVAA	1445	CSK
233	MLEVHIPSV	79856	SNX22
234	NLQRTVVTV	4297	MLL
235	SLDVYELFL	79586	CHPF
236	SLFDGFFLTA	25920	COBRA1
237	YLDRLIPQA	115209	OMA1
238	YQYGAVVTL	1380	CR2
239	VLIDDTVLL	116138	KLHDC3
240	ALVPTPALFYL	51528	JKAMP
241	FIPDFIPAV	56912	IFT46
242	GILDFZVFL	100124692,8972,93432	MGAM
243	GLPDLDIYL	23334	SZT2
244	ILEPFLPAV	6894	TARBP1
245	KLIQLPVVYV	9875	URB1
246	KLPVPLESV	285190,400966,5903,653489,727851,729540,729857,84220	RGPD4, RGPD1, RANBP2, RGPD3, RGPD8, RGPD6, RGPD2, RGPD5
247	KVLEMETTV	9810	RNF40
248	NLLEQFILL	64708	COPS7B
249	VLLESLVEI	149371	EXOC8
250	VLTNVGAAL	129285	PPP1R21
251	VLYELFTYI	3717	JAK2
252	YLGDLIMAL	3930,7108	LBR, TM7SF2

Tabla 2: Péptidos adicionales conformes a la presente invención sin previa relación conocida con el cáncer.

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
253	YSDDDVPSV	29028	ATAD2
254	FLYSETWNI	4519,8923205	MT-CYB
255	GMWNPNAPVFL	9910	RABGAP1L
256	ALQETPPQV	146206	RLTPR
257	FLQEWEVYA	57001	ACN9
258	RIYPFLLMV	10299	MARCH6
259	TVLDGLEFKV	10592	SMC2
260	RLDEAFDFV	1844	DUSP2
261	FLPETRIMTSV	11319	ECD
262	LMGPVVHEV	5116	PCNT

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
263	GLMDNEIKV	8795	TNFRSF10B
264	ILTGTPPGV	151313,51011	FAHD2B, FAHD2A
265	ILWHFVASL	23077	MYCBP2
266	QLTEMLPSI	689	BTF3
267	SLLETGSDLLL	57176	VARS2
268	VLFPLPTPL	11184	MAP4K1
269	VLQNVAFSV	597	BCL2A1
270	VVVDSDSLAFV	122961	ISCA2
271	YLLDQPVLEQRL	81887	LAS1L
272	KLDHTLSQI	4863	NPAT
273	AILLPQPPK	1761,6392,64147,642204,654434,84286,85363	DMRT1, SDHD, KIF9, LINC00338, TMEM175, TRIM5
274	KLLNLISKL	5366	PMAIP1
275	KLMDLEDCAL	23269	MGA
276	NMISYVVHL	204801	NLRP11
277	FLIDLNSTHGTFL	5511	PPP1R8
278	FLLFINHRL	4292	MLH1
279	NLAGENILNPL	56948	SDR39U1
280	SLLNHLPYL	201562	PTPLB
281	TLQTVPLTTV	1997	ELF1
282	YLLEQGAQV	55527	FEM1A
283	ALMPVTPQA	23683	PRKD3
284	KLQEQIHRV	196441	ZFC3H1
285	SITAVTPLL	63910	SLC17A9
286	HLTEDTPKV	50814	NSDHL
287	ILMGHSLYM	9786	KIAA0586
288	RLAPEIVSA	157285	SGK223
289	SLLAANNLL	9380	GRHPR
290	IASPVIAAV	127544	RNF19B
291	KIIDTAGLSEA	22954	TRIM32
292	KLINSQISL	5293	PIK3CD
293	GLAMVEAISYV	109	ADCY3
294	KLYGPEGLELV	3394	IRF8
295	SLAAVSQQL	7094	TLN1
296	FILEPLYKI	9343	EFTUD2
297	ILQNGLETL	89857	KLHL6
298	ALTDVILCV	89857	KLHL6
299	RLLEEEGVSL	64428	NARFL

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
300	IVLERNPEL	5257	PHKB
301	LQFDGIHVV	55294	FBXW7
302	SLAELDEKISA	51562	MBIP
303	FVWEASHYL	5442	POLRMT
304	ALIRLDDLFL	56902	PNO1
305	AMLAQQMQL	4154	MBNL1
306	AQVALVNEV	10075	HUWE1
307	FLLPVAVKL	3954	LETM1
308	SLLDQIPEM	9632	SEC24C
309	SLSFVSPSL	11108	PRDM4
310	VMAEAPPGV	9798	IST1
311	YLHRQVAAV	6890	TAP1

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

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
312	RLPDIPLRQV	55656	INTS8
313	ALSVRISNV	3766	KCNJ10
314	LIDDKGTIKL	983	CDK1
315	SLYDSIAFI	56978	PRDM8
316	SLSAFLPSL	54757	FAM20A
317	GLSNLGIKSI	122553	TRAPPC6B
318	KIQEMQHFL	4321	MMP12
319	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
320	LLWGNLPEI	729533, 653820	FAM72A, FAM72B
321	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
322	TLTNIIHNL	94101	ORMDL1
323	ILVDWLVQV	9133	CCNB2
324	LLYDAVHIV	2899	GRIK3
325	FLFVDPELV	146850	PIK3R6
326	KLTDVGIATL	115701	ALPK2
327	MLFGHPLLVSV	8237	USP11
328	ILFPDIIARA	64110	MAGEF1

La presente invención, además, se refiere en general a los péptidos acordes con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, como

por ejemplo, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar y las vías biliares.

Se prefiere especialmente al péptido –solo o en combinación– conforme con la presente invención que comprende la SEQ ID N.º 146. Se prefiere ante todo el péptido – solo o en combinación – que comprende la SEQ ID N.º 146 (véase la Tabla 1), y sus usos en la inmunoterapia del linfoma no hodgkiniano (LNH), del cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar y las vías biliares, pero preferentemente del LNH.

Tal y como se muestra a continuación en las Tablas 4A y B, 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.

Las tablas exponen 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 3. La sobrepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal que muestra la presentación más elevada. Los tejidos normales con los que se comparó la sobrepresentación fueron los siguientes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro, nervio central, colon, duodeno, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, leucocitos mononucleares, páncreas, nervio periférico, glándula

paratiroidea, peritoneo, hipófisis, pleura, recto, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroides, tráquea, uréter, vejiga urinaria y vena.

Tabla 1A: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer.

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
1	LLSGQLPTI	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
2	LLSEETPSA	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
3	LTIDTQYYL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
5	VLQGLTFTL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
6	TLITLPLLFL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma
7	NLLGMIFSM	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
8	ALYAVIEKA	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda
9	FLLDLDPLL	Leucemia linfocítica crónica
10	FLLVGTQIDL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de útero
11	GLDTVVALL	Cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, cáncer de útero
12	GLLLLVPLL	Melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
13	HLVPASWKL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma
15	IIIEDLLEA	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de útero
16	TLIAAILYL	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
17	VIIPLLSSV	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, melanoma

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
19	VLEAILPLV	Leucemia linfocítica crónica
20	YLIAGGDRWL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma
21	ALFKEAYSL	Cáncer de esófago
23	ALVEDIINL	Cáncer colorrectal, cáncer de mama, melanoma, cáncer de útero
24	AVLGFSFRL	Leucemia linfocítica crónica
25	FLDTSNQHLL	Leucemia linfocítica crónica
26	FLGSFIDHV	Melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero
27	FLNQESFDL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
28	FLSNANPSL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de útero
29	ILSDVTQGL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de útero
30	ILSTLDVEL	Cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de útero
31	KLYDEESLL	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de útero
32	VLNEDELPSV	Leucemia linfocítica crónica
33	LLANIVPIAMLV	Leucemia linfocítica crónica
34	LLWEDGVTEA	Cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
35	SLSSERYYL	Cáncer de ovario
36	VILDIPLLFET	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de útero
37	VLGNALEGV	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
38	YLTAEILELAGN	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
39	QLLPQGIVPAL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
40	FLNSVIVDL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
41	ILASIFETV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
42	YLQDLVERA	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
43	ALLEGVKNV	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario
44	FIIEEQSFL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
45	FILDDSALYL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
46	FLVEEIFQT	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
47	GLLPKLTAL	Cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de útero
48	KILDEDLYI	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
50	LLLDGLIYL	Leucemia linfocítica crónica
53	FLREYFERL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de útero
55	ILVEVDLVQA	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
56	GLQDLLFSL	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda
57	LQIGDFVSV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica
58	QLAPFLPQL	Cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
59	RLHREVAQV	Cáncer de esófago
60	SLLIDVITV	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
61	SLLNKDLSL	Cáncer de útero
62	ALAPYLDLL	Leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
63	ALIEEAYGL	Leucemia linfocítica crónica
64	FLVEVSNDV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
65	NLTDVSPDL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
67	LLATVNVAL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
68	QIAAFLFTV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
69	TLLAFPLLL	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
70	VLIEILQKA	Leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
73	YLGEEYPEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de útero
74	SLDLRPLEV	Cáncer de células renales, cáncer gástrico
76	ALADLVPVDVVV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer de útero
77	ALLDVSNNYGI	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
78	AMEEAVAQV	Cáncer de células renales, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
79	AMKEEKEQL	Leucemia mielógena aguda
80	YLFDEIDQA	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de útero
81	FIFSYITAV	Leucemia linfocítica crónica
82	FLIDGSSSV	Leucemia linfocítica crónica
83	FLMDDNMSNTL	Melanoma
84	FLQELQLEHA	Leucemia linfocítica crónica
85	GLAPAEVVVATVA	Leucemia linfocítica crónica, melanoma
86	GLATIRAYL	Cáncer de células renales, melanoma, cáncer de útero
87	GLFARIIMI	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
88	GLFDNRSGLPEA	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
90	HLDEVFLEL	Cáncer de pulmón microcítico
92	KLLFEIASA	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda
93	KLLGSLQLL	Cáncer de células renales, cáncer de mama
94	LLAGQATTAYF	Cáncer de células renales
95	LLFDLIPVVSV	Leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, cáncer de útero
96	LLLNENESLFL	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, melanoma, cáncer

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
		de ovario, cáncer de útero
97	LLNFSPGNL	Cáncer colorrectal
98	MLQDGIARL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma
100	RLIRTIAAI	Cáncer de células renales
101	SLDQSTWNV	Leucemia linfocítica crónica
102	SLFAAISGMIL	Leucemia linfocítica crónica
103	SLQDHLEKV	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica
104	VLLGLPLLV	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda
105	VLTPVILQV	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda
106	VLYELLQYI	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
108	YLAPENGYLM	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
109	YLFQFSAAL	Cáncer de células renales, cáncer de páncreas
110	YQYPFVLGL	Cáncer de útero
114	GLSDISPST	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
116	SLLDNLLTI	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma
117	VLATILAQL	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia mielógena aguda, cáncer de útero
118	VLDGMIYAI	Cáncer de útero
119	ELCDIILRV	Melanoma
121	YLTGYNFTL	Cáncer de útero
122	AISEAQESV	Cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de útero
124	FLGVVVPTV	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero
125	FVAPPTAAV	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
126	GLSIFIYRL	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria
127	HLMEENMIVYV	Melanoma
128	KLFDASPTFFA	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
129	SLFEASQQL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
130	VIFSYVLGV	Leucemia mielógena aguda, cáncer de útero
131	VLIEETDQL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma
132	VLQDQVDEL	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma
133	ALEELTGFREL	Cáncer de esófago
138	NLINNIFEL	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de vejiga urinaria
141	FLGELTLQL	Melanoma
144	GLITQVDKL	Leucemia mielógena aguda
146	GLLQQPPAL	Leucemia mielógena aguda
148	ICAGHVPGV	Leucemia mielógena aguda, cáncer de útero
149	ILNPVTTKL	Leucemia mielógena aguda
152	KIMYTLVSV	Cáncer de hígado
161	NLMLELETV	Cáncer de útero
163	SIFDAVLKGV	Cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de útero
164	SLFDGAVISTV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de útero
165	KLLEEIEFL	Cáncer de células renales, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
166	SLFSEVASL	Melanoma
169	SSLEENLLHQV	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica
171	TLLDVISAL	Leucemia mielógena aguda
174	VLVEITDVDFAA	Melanoma
179	FVDTNLYFL	Cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de útero
180	GILQLVESV	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de ovario
181	LLFDQNDKV	Cáncer de células renales, cáncer de hígado, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
182	LLPPPPPVA	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma
183	VLFETVLTI	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
184	AVLGTSWQL	Cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda
185	FIAQLNNVEL	Melanoma, cáncer de ovario
186	FLDVSRDFV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
		linfocítica crónica
188	GLEDEMYEV	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
189	SLSHLVPAL	Leucemia linfocítica crónica
190	GLIELVDQL	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de útero
191	GLSDISAQV	Leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de ovario
193	SLADSMPSL	Cáncer de mama, cáncer de útero
194	SLAPFDREPFTL	Cáncer de pulmón amicrocítico
195	ALIPDLNQI	Cáncer de útero
197	YLLTDNVVKL	Cáncer de células renales, cáncer de mama
198	GLLSAVSSV	Leucemia mielógena aguda, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
200	YLLDFEDRL	Leucemia linfocítica crónica
201	YLNISQVNV	Leucemia linfocítica crónica
204	RLCDIVVNV	Melanoma
206	SAVSGQWEV	Leucemia linfocítica crónica
207	GLVGLLEQA	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
208	FLAVSLPLL	Leucemia linfocítica crónica
209	FLLDTISGL	Cáncer colorrectal, cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
210	FLAEQFEFL	Leucemia linfocítica crónica
211	FIDDLFAFV	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma
212	FLIGQGAHV	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma
213	YINEDEYEV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario
214	FLFDGSMSL	Leucemia mielógena aguda
215	QLFEEEIEL	Cáncer de células renales, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
216	KVVSNLPAI	Leucemia mielógena aguda, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
217	AQFGAVLEV	Leucemia mielógena aguda, melanoma
218	ALDQFLEGI	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
219	ALLELENSV	Cáncer de hígado, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
221	FLAPDNSLLLA	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
222	FLIETGTLL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de útero
223	FLQDIPDGLFL	Leucemia linfocítica crónica
224	FLSPLLPLL	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica
225	GTYQDVGSLNIGDV	Leucemia linfocítica crónica
226	GVIDPVPEV	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
227	IIAEGIPEA	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de útero
228	IIAEYLSYV	Leucemia linfocítica crónica
229	ILSPWGAEV	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
230	IMDDDSYGV	Leucemia linfocítica crónica
232	KVMEGTVAA	Leucemia linfocítica crónica
233	MLEVHIPSV	Leucemia linfocítica crónica
234	NLQRTVVTV	Cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
235	SLDVYELFL	Cáncer colorrectal, cáncer de mama, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
236	SLFDGFFLTA	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de útero
237	YLDRLIPQA	Cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda, melanoma
238	YQYGAVVTL	Leucemia linfocítica crónica
239	VLIDDTVLL	Cáncer de hígado, leucemia mielógena aguda, melanoma
240	ALVPTPALFYL	Cáncer de mama
241	FIPDFIPAV	Cáncer de pulmón microcítico

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
242	GILDFZVFL	Leucemia mielógena aguda
243	GLPDLDIYL	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de útero
244	ILEPFLPAV	Melanoma, cáncer de útero
245	KLIQLPVVYV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
246	KLPVPLESV	Leucemia linfocítica crónica, melanoma
247	KVLEMETTV	Cáncer de útero
248	NLLEQFILL	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
249	VLLESLVEI	Melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
250	VLTNVGAAL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
251	VLYELFTYI	Leucemia linfocítica crónica
252	YLGDLIMAL	Leucemia linfocítica crónica
253	YSDDDVPSV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
254	FLYSETWNI	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma
255	GMWNPNAPVFL	Cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
257	FLQEWEVYA	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
258	RIYPFLLMV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
259	TVLDGLEFKV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, melanoma, cáncer de útero
260	RLDEAFDFV	Melanoma, cáncer de vejiga urinaria, Cáncer

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
		de útero
261	FLPETRIMTSV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria
263	GLMDNEIKV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de células renales, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
264	ILTGTPPGV	Cáncer de mama
265	ILWHFVASL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de útero
266	QLTEMLPSI	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
267	SLLETGSDLLL	Cáncer de hígado, cáncer de esófago
268	VLFPLPTPL	Leucemia linfocítica crónica
270	VVVDSDSLAFV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
271	YLLDQPVLEQRL	Leucemia linfocítica crónica, melanoma
273	AILLPQPPK	Cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de ovario
274	KLLNLISKL	Leucemia mielógena aguda
277	FLIDLNSTHGTFL	Leucemia linfocítica crónica
278	FLLFINHRL	Leucemia linfocítica crónica
279	NLAGENILNPL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
280	SLLNHLPYL	Leucemia linfocítica crónica
281	TLQTVPLTTV	Leucemia linfocítica crónica
282	YLLEQGAQV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, leucemia linfocítica crónica, melanoma
283	ALMPVTPQA	Leucemia linfocítica crónica
284	KLQEQIHRV	leucemia mielógena aguda
285	SITAVTPLL	Cáncer de células renales, leucemia mielógena aguda
287	ILMGHSLYM	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
288	RLAPEIVSA	Cáncer de hígado
289	SLLAANNLL	Cáncer de hígado, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
290	IASPVIAAV	Cáncer de hígado, cáncer de páncreas, leucemia linfocítica crónica, leucemia

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
		mielógena aguda, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
291	KIIDTAGLSEA	Leucemia linfocítica crónica
292	KLINSQISL	Leucemia linfocítica crónica
293	GLAMVEAISYV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
294	KLYGPEGLELV	Leucemia linfocítica crónica
296	FILEPLYKI	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de útero
299	RLLEEEGVSL	Cáncer colorrectal, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama
301	LQFDGIHVV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cerebro
302	SLAELDEKISA	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
303	FVWEASHYL	Cáncer de pulmón amicrocítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de esófago, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
304	ALIRLDDLFL	Cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, melanoma
305	AMLAQQMQL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama
306	AQVALVNEV	Cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
308	SLLDQIPEM	Cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares
309	SLSFVSPSL	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de útero
310	VMAEAPPGV	Cáncer de útero
311	YLHRQVAAV	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria

Tabla 4A: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas (enmienda de la Tabla 4A). La tabla expone, como la Tabla 4A, los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumores adicionales bien sobrepresentados en más del 5% de las muestras tumorales

analizadas, bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente entre las medias geométricas del tejido tumoral y del tejido normal superior a 3. La sobrepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal que muestra la presentación más elevada. Los tejidos normales con los que se comparó la sobrepresentación fueron los siguientes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro, nervio central, colon, duodeno, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, leucocitos mononucleares, páncreas, glándula paratiroides, nervio periférico, peritoneo, hipófisis, pleura, recto, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroides, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
2	LLSEETPSA	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
3	LTIDTQYYL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
5	VLQGLTFTL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
11	GLDTVVALL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
12	GLLLLVPLL	Cáncer de ovario, cáncer de esófago, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
16	TLIAAILYL	Cáncer de pulmón microcítico, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
23	ALVEDIINL	Cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
24	AVLGFSFRL	Leucemia mieloide aguda
26	FLGSFIDHV	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia mieloide aguda
28	FLSNANPSL	Cáncer de pulmón microcítico, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
30	ILSTLDVEL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
33	LLANIVPIAMLV	Melanoma
36	VILDIPLLFET	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
37	VLGNALEGV	Cáncer de pulmón microcítico
38	YLTAEILELAGN	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
39	QLLPQGIVPAL	Cáncer de hígado
41	ILASIFETV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

43	ALLEGVKNV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama
44	FIIEEQSFL	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
46	FLVEEIFQT	Leucemia mieloide aguda
47	GLLPKLTAL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
48	KILDEDLYI	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
54	DIFDAMFSV	Leucemia linfocítica crónica
55	ILVEVDLVQA	Cáncer de esófago
56	GLQDLLFSL	Melanoma
60	SLLIDVITV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, leucemia mieloide aguda
61	SLLNKDLSL	Cáncer de esófago, leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
66	KLAPIPVEL	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda
67	LLATVNVAL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
68	QIAAFLFTV	Leucemia mieloide aguda
69	TLLAFPLLL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
70	VLIEILQKA	Cáncer de pulmón microcítico, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
71	VLLDYVGNVQL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
73	YLGEEYPEV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
76	ALADLVPVDVVV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
88	GLFDNRSGLPEA	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
95	LLFDLIPVVSV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
96	LLLNENESLFL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
99	QLYDGATALFL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
103	SLQDHLEKV	Cáncer de útero
106	VLYELLQYI	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
107	VQAVSIPEV	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda
108	YLAPENGYLM	Cáncer de útero, leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
109	YLFQFSAAL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
110	YQYPFVLGL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
111	YLLDTLLSL	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
115	LLIDIIHFL	Leucemia mieloide aguda

121	YLTGYNFTL	Leucemia mieloide aguda
122	AISEAQESV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
124	FLGVVVPTV	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
128	KLFDASPTFFA	Cáncer de ovario, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
131	VLIEETDQL	Cáncer de mama
144	GLITQVDKL	Cáncer de esófago
146	GLLQQPPAL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
152	KIMYTLVSV	Leucemia mieloide aguda
163	SIFDAVLKGV	Cáncer de hígado, cáncer de vejiga urinaria, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
166	SLFSEVASL	Leucemia mieloide aguda
168	SLLSPLLSV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
171	TLLDVISAL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
179	FVDTNLYFL	Leucemia mieloide aguda
182	LLPPPPPVA	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
183	VLFETVLTI	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
185	FIAQLNNVEL	Leucemia mieloide aguda
188	GLEDEMYEV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
191	GLSDISAQV	Leucemia mieloide aguda
194	SLAPFDREPFTL	Melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
198	GLLSAVSSV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
201	YLNISQVNV	Leucemia mieloide aguda
205	TLFYESPHL	Leucemia linfocítica crónica
212	FLIGQGAHV	Cáncer de hígado
213	YINEDEYEV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
214	FLFDGSMSL	Cáncer de vejiga urinaria
216	KVVSNLPAI	Cáncer de riñón
217	AQFGAVLEV	Cáncer de riñón
218	ALDQFLEGI	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
220	FLAEAPTAL	Leucemia mieloide aguda
221	FLAPDNSLLLA	Leucemia mieloide aguda
224	FLSPLLPLL	Leucemia mieloide aguda
226	GVIDPVPEV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
227	IIAEGIPEA	Cáncer de riñón, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
228	IIAEYLSYV	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
235	SLDVYELFL	carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

236	SLFDGFFLTA	Cáncer de riñón, cáncer gástrico
239	VLIDDTVLL	Cáncer de útero
240	ALVPTPALFYL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
244	ILEPFLPAV	Leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda
246	KLPVPLESV	Leucemia mieloide aguda
247	KVLEMETTV	Cáncer de mama
248	NLLEQFILL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
251	VLYELFTYI	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
252	YLGDLIMAL	Leucemia mieloide aguda
253	YSDDDVPSV	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
254	FLYSETWNI	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
255	GMWNPNAPVFL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
256	ALQETPPQV	Leucemia mieloide aguda
258	RIYPFLLMV	Cáncer colorrectal
259	TVLDGLEFKV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
260	RLDEAFDFV	Cáncer de riñón, leucemia linfocítica crónica
263	GLMDNEIKV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
265	ILWHFVASL	Leucemia mieloide aguda
267	SLLETGSDLLL	Cáncer de vejiga urinaria, leucemia mieloide aguda
268	VLFPLPTPL	Leucemia mieloide aguda
280	SLLNHLPYL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
281	TLQTVPLTTV	Leucemia mieloide aguda
282	YLLEQGAQV	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
289	SLLAANNLL	Leucemia mieloide aguda
290	IASPVIAAV	Cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, Cáncer de útero
291	KIIDTAGLSEA	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
292	KLINSQISL	Leucemia mieloide aguda
296	FILEPLYKI	Leucemia mieloide aguda
297	ILQNGLETL	Cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, leucemia mieloide aguda
299	RLLEEEGVSL	Melanoma
300	IVLERNPEL	Leucemia mieloide aguda
301	LQFDGIHVV	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
302	SLAELDEKISA	Cáncer de útero, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
303	FVWEASHYL	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide

		de cabeza y cuello
306	AQVALVNEV	Cáncer de esófago, leucemia mieloide aguda
307	FLLPVAVKL	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
308	SLLDQIPEM	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
309	SLSFVSPSL	Leucemia mieloide aguda, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
314	LIDDKGTIKL	Cáncer de vejiga urinaria

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 146, para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA).

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 146, para –en una forma de realización combinada preferida– el tratamiento del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los péptidos conformes a la presente invención para el tratamiento –preferentemente combinado– de una enfermedad proliferativa seleccionada del grupo constituido por el LNH, el cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar y las vías biliares.

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

La presente invención se refiere, además, a péptidos acordes con la presente invención en que cada uno de dichos péptidos consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 146.

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 más en concreto 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 expresen y/o 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 146, o una variante de dichas secuencias de aminoácidos.

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

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

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

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

La presente invención se refiere además al uso conforme con la presente invención, en que dichas células cancerosas son de LNH, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de la vesícula biliar y las vías biliares, pero preferentemente del LNH.

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 linfoma no hodgkiniano (LNH). 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.

En la siguiente descripción de los productos de expresión subyacentes (polipéptidos) de los péptidos conformes a la invención se dan a conocer diversos usos contra otros tipos de enfermedades tumorales, tanto terapéuticos como diagnósticos.

El ACHE codifica la acetilcolinesterasa, que hidroliza el neutrotransmisor acetilcolina en las sinapsis colinérgicas cerebrales y en las placas neuromusculares, con lo que pone fin a la transmisión de la señal (RefSeq, 2002). El ACHE puede servir como marcador y regulador de la apoptosis. Está implicado en la adhesión, la diferenciación y la proliferación celulares y es un gen oncosupresor prometedor (Greig et al., 2013; Xi et al., 2015). ACHE y BCHE participan en la oncogenia pero su relación aún no está clara (Shan, 2004a). El ACHE se expresa anormalmente en el meningioma, el glioma, neurinoma acústico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, fibrosarcoma y cáncer de ovario (Russo et al., 2006; Shan, 2004a; Shan, 2004b). El tratamiento del síndrome miasténico de Lambert-Eaton, que presenta una forma idiopática y otra asociada a tumor, incluye el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa (Mareska and Gutmann, 2004; Verschuuren et al., 2006). Tanto los péptidos escindidos de la molécula original

surgida de ACHE como la propia proteína original pueden actuar independientemente como moléculas de señalización (Bukowska, 2005; Halliday and Greenfield, 2012).

El ACN9 (también llamado factor 3 de ensamblaje del complejo de la succinato deshidrogenasa (SDHAF3)) codifica el homólogo ACN9 y está localizado en el cromosoma 7q21.3 (RefSeq, 2002). El montaje deficiente del complejo SDH o su ausencia pueden derivar en cáncer y síndromes neurodegenerativos (Van Vranken et al., 2015). Diversos polimorfismos mononucleotídicos del ACN9 aparecen vinculados con el cáncer de mama (Kibriya et al., 2009).

CDC42 codifica la proteína 42 del ciclo de división celular, una GTPasa pequeña de la subfamilia Rho que regula los sistemas de transducción de señales que controlan diversas funciones celulares tales como la morfología, la migración y la endocitosis celular y la progresión del ciclo celular (RefSeq, 2002). CDC42 controla la polaridad epitelial así como la migratoria en concurso con otros reguladores (Gandalovicova et al., 2016). c-Cbl permanece inhibido en los glioblastomas y en el cáncer de mama (*basal-like*) por la alteración de Cool-1/betapix y CDC42 (Noble et al., 2015). Los factores de intercambio de CDC42, las denominadas proteínas de la familia Dock, están implicadas en el cáncer (Gadea and Blangy, 2014). La CDC42 es una GTPasa Rho localizada en las uniones estrechas epiteliales (Lane et al., 2014; Zihni and Terry, 2015). CDC42 es capaz de activar a STAT3 que se sobreexpresa en diversos tipos de cáncer (Raptis et al., 2011). La desregulación de CDC42 está implicada en el cáncer. Se ha constatado que la señalización de CDC42 interviene en la transformación celular, la división celular, la invasión y la migración celulares, la formación de invadopodios, la actividad enzimática, la formación de filopodios, la alteración del citoesqueleto de actina y la polaridad celular. CDC42 regula la invasión en el glioblastoma (Stengel and Zheng, 2011; Albergaria et al., 2011; Kwiatkowska and Symons, 2013; Qadir et al., 2015; Lin and Zheng, 2015). La cinasa 1 asociada a la CDC42 activada (ACK1/TNK2) es una cinasa oncógena. La cinasa 5 activada por p21 (PAK) es una cinasa efectora posterior de CDC42 que aparece sobreexpresada en varias entidades tumorales. La PAK1 está regulada al alza en el cáncer y está vinculada con la progresión tumoral. Las cinasas

de unión a CDC42 relacionadas con la distrofia miotónica (MRCK) aparecen vinculadas con el cáncer humano (Mahajan and Mahajan, 2010; Eswaran et al., 2012; Maruta, 2014; Unbekandt and Olson, 2014; Dammann et al., 2014; Wen et al., 2014; Mahajan and Mahajan, 2015). CDC42 controla la actividad de la proteína cinasa C atípica polarizada (Prehoda, 2009). El eje CDC42-IQGAP1 podría impulsar el carcinoma gástrico inducido por *H. pylori* al regular negativamente a los oncosupresores E-cadherina y beta1-integrina (White et al., 2009; Osman et al., 2013). CDC42 aparece regulado a través de la vía de señalización de mTORC2 y podría serlo a través de la vía de Notch (Dotto, 2008; Zhou and Huang, 2011). Tiam1, GEFs y RhoA son activadores de CDC42, mientras que Slit2 y Robo1 son inhibidores. CDC42 es regulado por CXCL12 y DLC-1 (Boissier and Huynh-Do, 2014; Sinha and Yang, 2008; Kim et al., 2009; Ben-Baruch, 2009; Xu et al., 2010; O'Connor and Chen, 2013). CDC42 es un efector posterior de CD44 y HMGB1 lo que deriva en angiogenia, potencial replicador ilimitado, invasión tisular y metástasis (Bourguignon, 2008; Hu et al., 2014). CDC42 se sobreexpresa en varias entidades tumorales y podría estar correlacionada con un pronóstico malo. La sobreexpresión de CDC42 en el cáncer de mama podría contribuir a la acumulación de ErbB1 (Hirsch and Wu, 2007; Arias-Romero and Chernoff, 2013). El reservorio de CDC42 en el aparato de Golgi está regulado por un complejo de GM130 y RasGRF. La GM130 se pierde progresivamente en el cáncer colorrectal (Baschieri and Farhan, 2015).

DCAKD codifica a la proteína provista de dominio defosfo-CoA cinasa y está localizado en el cromosoma 17q21.31 (RefSeq, 2002). DCAKD está regulado al alza en el cáncer de mama (Riis et al., 2012).

HAPLN3 codifica la proteína 3 de enlace del hialuronano y el proteoglucano, que podría actuar en la unión del ácido hialurónico y en la adhesión celular (RefSeq, 2002). Una signatura de tres genes que incluye a HAPLN3 puede servir como marcador de la metilación en el cáncer de próstata (Strand et al., 2014). En el cáncer de mama se ha descrito un producto de la fusión génica del MFGE8 con el HAPLN3 (Varley et al., 2014). El HAPLN3 está hipermetilado en el cáncer de próstata (Haldrup et al., 2013). El

HAPLN3 aparece regulado al alza en el cáncer de mama y podría servir como biomarcador (Kuo et al., 2010).

JAK3 codifica la cinasa Janus 3, miembro de la familia de tirosina cinasas de las cinasas Janus (JAK), implicadas en la transducción de señales al interior de la célula a través de receptores de citocinas. Se expresa predominantemente en células inmunitarias y transduce las señales en respuesta a su activación mediante la fosforilación de tirosinas por parte de los receptores de interleucina (RefSeq, 2002). JAK3 aparece desregulado en distintos tipos de cáncer como son el linfoma de linfocitos T cutáneo, linfoma extraganglionar de células NK de tipo nasal, leucemia linfoblástica aguda, carcinoma de células renales y carcinoma de colon (Lin et al., 2005; de et al., 2013; Bouchekioua et al., 2014; Sibbesen et al., 2015; Losdyck et al., 2015). La expresión de JAK3 afecta a sus dianas ulteriores STAT3, STAT5, MAPK, pS6, así como al microARN oncosupresor miR-22, Bcl-2, Bcl-X, ciclina D2, p21 y p27. Por consiguiente, JAK2 controla el crecimiento y la apoptosis celulares así como la progresión del ciclo celular (Lin et al., 2005; Sibbesen et al., 2015; Agarwal et al., 2015).

KDM2B codifica la lisina desmetilasa 2B, miembro de la familia de proteínas con F-box que se caracteriza por poseer un motivo de unos 40 aminoácidos, el F-box. Las proteínas F-box constituyen una de las cuatro subunidades del complejo de la ubiquitina proteína ligasa llamado SCF (SKP1-culina-F-box), que interviene en la ubiquitinización dependiente de fosforilación (RefSeq, 2002). La sobreexpresión de KDM2B acaba estimulando la migración celular al unirse a genes asociados a la migración (Rohde et al., 2016). MiR-448, que se sobreexpresa en el cáncer gástrico, regula a la baja a KDM2B. Myc es una diana clave de KDM2B (Hong et al., 2016). KDM2B interviene en el desarrollo de las células hematopoyéticas y muestra papeles opuestos en la progresión tumoral (Andricovich et al., 2016). KDM2B actúa como un correpresor de BCL6 (Oliviero et al., 2015). Además, participa en la vía de PI3K/mTOR y promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis celular en el carcinoma nasofaríngeo (Ren et al., 2015). La generación local de fumarato inhibe a KDM2B, derivando en la activación de la reparación del ADN (Jiang et al., 2015). La eliminación

de KDM2B ocasiona la parada del crecimiento dependiente de p53 (Penzo et al., 2015). En tumores cerebrales y renales pediátricos se pueden hallar duplicaciones internas en tándem de BCOR y PFUD. BCORL1 forma parte del complejo del grupo Polycomb 1 (PRC1.1) que es reclutado por KDM2B para facilitar la represión génica. El PRC1.1 es importante para las células madre leucémicas y la regulación a la baja de miembros del complejo como KDM2B reduce la proliferación celular (Yamamoto et al., 2014; He et al., 2013; Blackledge et al., 2014; van den Boom et al., 2016; Wong et al., 2016). KDM2B es un factor no Yamanaka implicado en la reprogramación celular (Liang et al., 2012; Liu et al., 2015). En el cáncer de vejiga, KDM2B interviene en la proliferación y migración celulares y en la angiogenia (Kottakis et al., 2011). KDM2B se sobreexpresa en varias entidades como el cáncer de mama triple negativo seudobasal (*basal-like*) y el cáncer de páncreas y regula la proliferación celular, la estructura de la cromatina y la senescencia en las células HeLa. Es un regulador positivo de la glucólisis, la glutaminolisis y la síntesis de pirimidina (Tzatsos et al., 2011; Tzatsos et al., 2013; Kottakis et al., 2014; Bacalini et al., 2015; Yu et al., 2015). KDM2B es un oncogén implicado en el desarrollo de la leucemia al alterar la diferenciación mediada por Nsg2 (He et al., 2011; Nakamura et al., 2013; Ueda et al., 2015). La KDM2B es una proteína antiapoptósica dependiente de NF-kappaB. La degradación de c-Fos dependiente de la KDM2B regula negativamente la proliferación celular (Ge et al., 2011; Han et al., 2016).

KDM5B codifica la proteína JARID1B, una histona desmetilasa específica de la lisina que es capaz de reprimir ciertos genes oncosupresores al desmetilar a la lisina 4 de la histona H3 (RefSeq, 2002). Como factor epigenético, la KDM5B sustenta la proliferación, la migración y la invasión del carcinoma epidermoide oral humano, el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, el cáncer de mama y el cáncer de pulmón al suprimir la expresión de p53 (Shen et al., 2015; Tang et al., 2015; Zhao and Liu, 2015; Lin et al., 2015). Asimismo conocida como JARID1B, KDM5B promueve la metástasis y la transición epitelio-mesenquimática en diversos tipos de tumores a través de la vía de señalización PTEN/AKT (Tang et al., 2015).

PTTG1 codifica el factor transformante tumoral hipofisario 1. La proteína codificada es una homóloga de las proteínas de fijación de levadura, que impiden que las separinas promuevan la separación de las cromátidas hermanas. Es un sustrato del complejo promotor de la anafase (APC) que se asocia con una separina hasta la activación del APC (RefSeq, 2002). El PTTG1 se sobreexpresa en distintos tipos de cáncer como el cáncer oral, el cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer cutáneo. Los niveles elevados de esta proteína están asociados con metástasis y un desenlace clínico malo (Noll et al., 2015; Yoon et al., 2012; Huang et al., 2012; Zhang et al., 2014; Chen et al., 2015). PTTG1 está regulado al alza de manera dependiente del complejo mTOR 1. Además, inhibe la fosforilación de SMAD3 dependiente del TGF-beta1 con lo que promueve así el crecimiento celular (Zhang et al., 2015; Chen et al., 2016).

PTTG2 codifica el factor transformante tumoral hipofisario 2 y está localizado en el cromosoma 4p12 (RefSeq, 2002). Se ha observado la sobreexpresión del gen PTTG2 en el glioma de alto grado, mientras que en tejidos cancerosos hepáticos de pacientes no se le ha hallado expresado con profusión (Yang et al., 2013; Cho-Rok et al., 2006). Se ha constatado que los niveles elevados PTTG2 promueven la proliferación y la invasión celular durante la progresión del glioblastoma (Guo et al., 2016).

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

TMEM67 codifica la proteína transmembrana 67 que se localiza asociada al cilio primario y a la membrana plasmática. El gen interviene en la migración de los centríolos hacia la membrana apical y en la formación del cilio primario. Defectos en este gen son una causa del síndrome de Meckel de tipo 3 (MKS3) y del síndrome de Joubert de tipo 6 (JBTS6) (RefSeq, 2002). TMEM67 interviene en la formación de los cilios y la presencia de cilios defectuosos pueden causar coloboma ocular, tumores linguales y meduloblastoma (Han et al., 2010; Parisi, 2009; Yang et al., 2015; Han and Alvarez-Buylla, 2010).

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 o 14 o más aminoácidos, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos de la invención) pueden tener hasta 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más aminoácidos de longitud.

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

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
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%
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 146 o una variante de la misma que es un 88% homóloga a la SEQ ID N.º 146, 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 de la SEQ ID N.º 146. 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 la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 146, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y será capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unión a moléculas MHC de clase I o II. Las variantes de la presente invención conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín definido en los aspectos de la invención.

Los péptidos originales (sin modificar) descritos aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Preferentemente tales sustituciones estarían situadas al final de la cadena de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, si un aminoácido es reemplazado por un aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrofóbico que es sustituido por otro aminoácido hidrofóbico. Aún más conservador sería el reemplazo de aminoácidos de

tamaño y naturaleza química igual o similar como, por ejemplo, si una leucina se reemplaza por isoleucina. En diversos estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras, y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, siendo ésta la base para la definición de las “sustituciones conservadoras”.

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

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

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, se pueden usar también otros aminoácidos no convencionales (distintos de

los aminoácidos naturales que constituyen las proteínas) con fines de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos acordes con la presente invención.

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

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

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

Tabla 6: Variantes y motivos de los péptidos acordes con las SEQ ID N.º 2, 5 y 8.

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

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

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
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 la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 146.

«Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a cualquiera de la SEQ ID N.º 146 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.

Otra realización de la presente invención se refiere un péptido no natural en la que dicho péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 146 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, figuras 1A hasta).

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 linfoma no hodgkiniano (N= 18 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 18 pacientes con linfoma no hodgkiniano.

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 linfoma no hodgkiniano (LNH) se purificaron y los péptidos asociados al HLA se aislaron y se analizaron con cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem (CL-EM) (véanse los ejemplos). Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de LNH primario, que confirman su presentación en el LNH primario.

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos de LNH 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, la 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 LNH, 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 LNH 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 de ganglios linfáticos 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 LNH, 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 LNH que presenten los péptidos derivados.

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

La presente descripción 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 146 y al menos otro péptido adicional,

preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

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

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

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

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

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

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

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante

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

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

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

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

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

plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores dotados del promotor del CMV (por ejemplo de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable, expresión en el citoplasma o secreción, y marcador de los extremos N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, c-myc o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, la purificación y el análisis de la proteína recombinante. Las fusiones con doble etiqueta aportan flexibilidad a la detección.

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

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

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

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 o anti-CD28.

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

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

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

Es posible seleccionar aptámeros de ADN para desvelar propiedades de reconocimiento de amplio espectro contra varias células cancerosas, y particularmente las derivadas de tumores sólidos, en tanto que las células sanas primarias y no

oncogénicas no son reconocidas. Si los aptámeros descubiertos reconocieran no solo un subtipo de tumor concreto sino que interaccionaran con una serie de tumores, se convertirían en una herramienta aplicable para el diagnóstico y la terapéutica de amplio espectro.

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

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

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con la SEQ ID N.º 146, 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 146 o a una variante de la misma que es al menos un 88% homóloga

(preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 146 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 146 o a una variante de la misma que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 146, en que dicho péptido o variante tiene una longitud total de 8 a 100, preferiblemente de 8 a 30, y más preferiblemente de 8 a 14 aminoácidos.

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

La presente invención se refiere, además, a los péptidos acordes con la presente invención en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 146.

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 LNH.

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 146, 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 se refiere además al uso conforme a la invención, en que dichas células cancerosas son células de LNH u otras células de tumores hematológicos o

sólidos, como el cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, o cáncer de la vesícula biliar y las vías biliares.

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 LNH. 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 LNH, introducción de una toxina en una célula de LNH que exprese un gen marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del LNH 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 LNH, 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 146 del polipéptido, o una variante o

fragmento del mismo, se puede expresar en células procariotas (p. ej., bacterias) o eucariotas (p. ej., células de levadura, insecto o mamífero), a partir de 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 LNH 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 LNH, 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 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 adicionales 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 seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (Kd) es inferior a 1 x 10 μM.

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

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 146, 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 146.

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 LNH, el medicamento de la invención se usa preferentemente para tratar el LNH.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir una composición farmacéutica personalizada 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 LNH 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 LNH, 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 LNH, 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 (LNH) 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 LNH.

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 LNH 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 LNH. 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 a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 146. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 112, de la SEQ ID N.º 114 a la SEQ ID N.º 119, de la SEQ ID N.º 121 a la SEQ ID N.º 145, de la SEQ ID N.º 147 a SEQ ID N.º 202, o de la SEQ ID N.º 204 a la SEQ ID N.º 311 como ejemplos de referencia.

FIGURAS

Las Figuras 1A a P muestran la sobrepresentación de varios péptidos en tejidos normales (barras blancas) y en el linfoma no hodgkiniano (barras negras).

Figura 1A) Símbolo del gen: TOX2, Péptido: LLSGQLPTI (SEQ ID N.º: 1); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 3 glándulas suprarrenales, 15 muestras de células sanguíneas, 12 vasos sanguíneos, 10 médulas óseas, 7 cerebros, 8 mamas, 2 cartílagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 6 corazones, 14 riñones, 19 intestinos gruesos, 20 hígados, 45 pulmones, 8 ganglios linfáticos, 7 nervios, 3 ovarios, 10 páncreas, 3 glándulas paratiroideas, 1 peritoneo, 5 hipófisis, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7

glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 11 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 6 testículos, 2 timos, 2 tiroides, 9 tráqueas, 3 uréteres, 8 vejigas urinarias, 5 úteros, 6 esófagos y 18 muestras de LNH. El péptido además ha sido detectado en 1/84 cánceres de pulmón, 1/17 leucemias linfocíticas crónicas, 1/20 estirpes celulares de cáncer de páncreas, 1/20 cánceres de ovario y 1/16 cánceres de útero. Figura 1B) Símbolo del gen: TAP1, Péptido: VLQGLTFTL (SEQ ID N.º: 5); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 3 glándulas suprarrenales, 15 muestras de células sanguíneas, 12 vasos sanguíneos, 10 médulas óseas, 7 cerebros, 8 mamas, 2 cartílagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 6 corazones, 14 riñones, 19 intestinos gruesos, 20 hígados, 45 pulmones, 8 ganglios linfáticos, 7 nervios, 3 ovarios, 10 páncreas, 3 glándulas paratiroideas, 1 peritoneo, 5 hipófisis, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 11 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 6 testículos, 2 timos, 2 tiroides, 9 tráqueas, 7 uréteres, 8 vejigas urinarias, 5 úteros, 6 esófagos y 18 muestras de LNH. El péptido además ha sido detectado en 4/101 cánceres de pulmón, 1/18 cánceres de mama, 1/17 leucemias linfocíticas crónicas, 2/17 cánceres de la vesícula biliar y las vías biliares, 2/16 melanomas, 2/20 cánceres de ovario y 1/15 cánceres de vejiga urinaria. Figura 1C) Símbolo del gen: SLC20A1, Péptido: ILASIFETV (SEQ ID N.º: 41); Tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos adiposos, 3 glándulas suprarrenales, 15 muestras de células sanguíneas, 12 vasos sanguíneos, 10 médulas óseas, 7 cerebros, 8 mamas, 2 cartílagos, 2 ojos, 3 vesículas biliares, 6 corazones, 14 riñones, 19 intestinos gruesos, 20 hígados, 45 pulmones, 8 ganglios linfáticos, 7 nervios, 3 ovarios, 10 páncreas, 3 glándulas paratiroideas, 1 peritoneo, 5 hipófisis, 6 placentas, 3 pleuras, 3 próstatas, 7 glándulas salivales, 5 músculos esqueléticos, 11 pieles, 3 intestinos delgados, 11 bazos, 5 estómagos, 6 testículos, 2 timos, 2 tiroides, 9 tráqueas, 7 uréteres, 8 vejigas urinarias, 5 úteros, 6 esófagos y 18 muestras de LNH. El péptido además ha sido detectado en 10/101 cánceres de pulmón, 4/18 leucemias mielógenas agudas, 1/18 cánceres de mama, 1/17 leucemias linfocíticas crónicas, 3/20 estirpes de cáncer de páncreas, 2/17 cánceres de la vesícula biliar y las vías biliares, 4/16 melanomas, 1/20 cánceres de ovario, 2/19 cánceres de páncreas, 1/38 cánceres de próstata, 2/22 cánceres de riñón y 1/15 cánceres de vejiga urinaria. Figura 1D) Símbolo del gen:

COPS7B, Péptido: NLLEQFILL (SEQ ID N.º: 248); Muestras de izquierda a derecha: 4 estirpes de células cancerosas, 6 tejidos normales (1 ganglio linfático, 3 bazos, 1 estómago y 1 útero), 55 tejidos cancerosos (2 cánceres de cerebro, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de ciego, 6 cánceres de colon, 6 leucemias leucocíticas, 2 cánceres de hígado, 10 cánceres de pulmón, 8 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de células mieloides, 3 cánceres de ovario, 1 cáncer de próstata, 1 cáncer de recto, 4 cánceres de piel, 2 cánceres de estómago, 3 cánceres de vejiga urinaria y 4 cánceres de útero). Las discrepancias relativas a la lista de tipos de tumores entre la figura 1D y la tabla 4A pueden obedecer al mayor rigor de los criterios de selección aplicados en esta última (para más detalles, véase la tabla 4A). El conjunto analizado de tejidos normales y de estirpes de células tumorales y xenoinjertos es el mismo que el de la Figuras 1A a C. Figura 1E) Símbolo del gen: KDM5B, Péptido: LLSEETPSA (SEQ ID N.º 2); Muestras de izquierda a derecha: 1 cultivo primario, 40 tejidos cancerosos (1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de cerebro, 2 cánceres de mama, 8 cánceres de cabeza y cuello, 4 leucemias leucocíticas, 1 cáncer hepático, 7 cánceres de pulmón, 6 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres de células mieloides, 1 cáncer de ovario, 3 cánceres de piel, 3 cánceres de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero). Figura 1F) Símbolo del gen: CDC42, Péptido: FLLVGTQIDL (SEQ ID N.º 10); Muestras de izquierda a derecha: 2 estirpes celulares, 10 tejidos cancerosos (2 cánceres de mama, 1 cáncer de cabeza y cuello, 1 leucemia leucocítica, 1 cáncer de pulmón, 4 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de útero). Figura 1G) Símbolo del gen: HAPLN3, Péptido: GLLLLVPLL (SEQ ID N.º 12); Muestras de izquierda a derecha: 16 tejidos cancerosos (1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 1 cáncer colorrectal, 1 cáncer de esófago, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de cabeza y cuello, 2 cánceres de pulmón, 5 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres de ovario, 1 cáncer de piel). Figura 1H) Símbolo del gen: JAK3, Péptido: HLVPASWKL (SEQ ID N.º 13); Muestras de izquierda a derecha: 10 tejidos cancerosos (1 leucemia leucocítica, 1 cáncer de pulmón, 5 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de piel, 1 cáncer de testículo). Figura 1I) Símbolo del gen: TMEM67, Péptido: FLGSFIDHV (SEQ ID N.º 26); Muestras de izquierda a derecha: 1 estirpe celular, 9 tejidos cancerosos (1 cáncer de cerebro, 1 cáncer de pulmón, 1 cáncer ganglionar, 1 cáncer de células mieloides, 2 cánceres de ovario, 2 cánceres de

piel, 1 cáncer de útero). Figura 1J) Símbolos del gen: PTTG1, PTTG2, Péptido: ILSTLDVEL (SEQ ID N.º 30); Muestras de izquierda a derecha: 29 tejidos cancerosos (1 cáncer de médula ósea, 2 cánceres de colon, 1 cáncer de vesícula biliar, 3 cánceres de cabeza y cuello, 1 cáncer de riñón, 5 cánceres de pulmón, 7 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de ovario, 5 cánceres de piel, 2 cánceres de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero). Figura 1K) Símbolo del gen: DCAKD, Péptido: VILDIPLLFET (SEQ ID N.º 36); Muestras de izquierda a derecha: 2 estirpes celulares, 20 tejidos cancerosos (1 cáncer de cerebro, 1 cáncer de mama, 1 cánceres colorrectal, 1 cáncer de cabeza y cuello, 1 leucemia leucocítica, 1 cáncer de hígado, 3 cánceres de pulmón, 4 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de ovario, 4 cánceres de piel, 1 cáncer de útero). Figura 1L) Símbolo del gen: KDM2B, Péptido: ALLEGVKNV (SEQ ID N.º 43); Muestras de izquierda a derecha: 13 tejidos cancerosos (1 cáncer de mama, 1 leucemia leucocítica, 1 cáncer de pulmón, 6 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de ovario, 1 cáncer de recto). Figura 1M) Símbolo del gen: ACHE, Péptido: SLDLRPLEV (SEQ ID N.º 74); Muestras de izquierda a derecha: 1 estirpe celular, 2 tejidos normales (1 ganglio linfático, 1 bazo), 24 tejidos cancerosos (3 cánceres de cerebro, 1 cáncer de colon, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de riñón, 1 cáncer de pulmón, 12 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de piel, 2 cánceres de estómago, 1 cáncer de testículo). Figura 1N) Símbolo del gen: CYTB, Péptido: FLYSETWNI (SEQ ID N.º 254); Muestras de izquierda a derecha: 7 estirpes celulares, 15 tejidos cancerosos (1 cáncer de colon, 2 cánceres de cabeza y cuello, 3 leucemias leucocíticas, 1 cáncer de hígado, 6 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de piel). Figura 1O) Símbolo del gen: ACN9, Péptido: FLQEWEVYA (SEQ ID N.º 257); Muestras de izquierda a derecha: 2 estirpes celulares, 11 tejidos cancerosos (2 leucemias leucocíticas, 1 cáncer de hígado, 4 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de células mieloides, 2 cánceres de piel, 1 cáncer de vejiga urinaria). Figura 1P) Símbolo del gen: SMC2, Péptido: TVLDGLEFKV (SEQ ID N.º 259); Muestras de izquierda a derecha: 1 cultivo primario, 14 tejidos cancerosos (1 cáncer de cabeza y cuello, 3 leucemias leucocíticas, 3 cánceres de pulmón, 3 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de ovario, 2 cánceres de piel).

Las Figuras 1A a C 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 linfoma no hogdkiniano (LNH) en un conjunto de tejidos normales (barras blancas) y en 10 muestras de LNH (barras negras). Tejidos de izquierda a derecha: 6 arterias, 2 muestras de 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 glándula tiroides, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículo, 1 timo, 1 útero y 10 muestras de LNH. Figura 2A) Símbolo del gen: MIXL1. Figura 2B) Símbolo del gen: CCR4. Figura 2C) Símbolo del gen: HIST1H1B.

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.

Las Figuras 4A a C muestran 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 253 (A, recuadro izquierdo), el péptido de SEQ ID N.º 258 (B, recuadro izquierdo) o el péptido de SEQ ID N.º 260 (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 253 (A), A*02/SEQ ID N.º 258 (B) o A*02/SEQ ID N.º 260 (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 a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 146. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 112, de la SEQ ID N.º 114 a la SEQ ID N.º 119, de la SEQ ID N.º 121 a la SEQ ID N.º 145, de la SEQ ID N.º 147 a SEQ ID N.º 202, o de la SEQ ID N.º 204 a la SEQ ID N.º 311 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, MI EE. UU. y Royston, Herts, Reino Unido); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE.UU.).

Los tejidos normales se obtuvieron de Asterand (Detroid, MI, EE.UU. y Royston, Herts, EE.UU.); Bio-Options Inc. (Brea, CA, EE.UU.); BioServe (Beltsville, MD, EE.UU.); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, EE.UU.); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE.UU.); Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto (KPUM); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, 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 Tübinga (Tübinga, 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 LNH 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, arteria, vena, médula ósea, cerebro, nervio periférico y central, colon, recto, intestino delgado incluido el duodeno, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, leucocitos mononucleares, páncreas, glándula paratiroidea, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, piel, bazo, estómago, timo, glándula tiroidea, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido
1	LLSGQLPTI	+++
2	LLSEETPSA	+++
3	LTIDTQYYL	+++
5	VLQGLTFTL	+++
6	TLITLPLLFL	+++
7	NLLGMIFSM	+++
8	ALYAVIEKA	+++
9	FLLDLDPLL	+++
10	FLLVGTQIDL	+++
11	GLDTVVALL	+++
12	GLLLLVPLL	+++
13	HLVPASWKL	+++
15	IIIEDLLEA	+++
16	TLIAAILYL	+++
17	VIIPLLSSV	+++
18	KLTDQPPLV	+++
19	VLEAILPLV	+++
20	YLIAGGDRWL	+++
21	ALFKEAYSL	+++
22	ALKKHLTSV	+++
23	ALVEDIINL	+++
24	AVLGFSFRL	+++
25	FLDTSNQHLL	+++
26	FLGSFIDHV	+++
27	FLNQESFDL	+++
28	FLSNANPSL	+++
29	ILSDVTQGL	+++
30	ILSTLDVEL	+++
31	KLYDEESLL	+++
32	VLNEDELPSV	+++
33	LLANIVPIAMLV	+++
34	LLWEDGVTEA	+++
35	SLSSERYYL	+++
36	VILDIPLLFET	+++
37	VLGNALEGV	+++
38	YLTAEILELAGN	+++

40	FLNSVIVDL	+
41	ILASIFETV	+++
43	ALLEGVKNV	+
44	FIIEEQSFL	+++
45	FILDDSALYL	+
46	FLVEEIFQT	++
47	GLLPKLTAL	+
49	TILGDPQILL	+++
50	LLLDGLIYL	+
53	FLREYFERL	+++
54	DIFDAMFSV	+++
55	ILVEVDLVQA	++
56	GLQDLLFSL	++
57	LQIGDFVSV	+
60	SLLIDVITV	+++
61	SLLNKDLSL	+
62	ALAPYLDLL	+++
64	FLVEVSNDV	++
65	NLTDVSPDL	+++
67	LLATVNVAL	+++
69	TLLAFPLLL	+
71	VLLDYVGNVQL	+++
72	TLQEETAVYL	+++
74	SLDLRPLEV	+
75	AALKYIPSV	+++
76	ALADLVPVDVVV	+++
77	ALLDVSNNYGI	+++
78	AMEEAVAQV	+++
79	AMKEEKEQL	+++
80	YLFDEIDQA	+++
81	FIFSYITAV	+++
82	FLIDGSSSV	+++
83	FLMDDNMSNTL	+++
84	FLQELQLEHA	+++
85	GLAPAEVVVATVA	+++
86	GLATIRAYL	+++
87	GLFARIIMI	+++

88	GLFDNRSGLPEA	+++
89	GLTALHVAV	+++
90	HLDEVFLEL	+++
91	HLSSTTAQV	+++
92	KLLFEIASA	+++
93	KLLGSLQLL	+++
94	LLAGQATTAYF	+++
95	LLFDLIPVVSV	+++
96	LLLNENESLFL	+++
97	LLNFSPGNL	+++
98	MLQDGIARL	+++
99	QLYDGATALFL	+++
100	RLIRTIAAI	+++
101	SLDQSTWNV	+++
102	SLFAAISGMIL	+++
103	SLQDHLEKV	+++
104	VLLGLPLLV	+++
105	VLTPVILQV	+++
106	VLYELLQYI	+++
107	VQAVSIPEV	+++
108	YLAPENGYLM	+++
109	YLFQFSAAL	+++
110	YQYPFVLGL	+++
111	YLLDTLLSL	+++
112	FLAILPEEV	+++
114	GLSDISPST	+++
115	LLIDIIHFL	+++
116	SLLDNLLTI	+
117	VLATILAQL	+++
118	VLDGMIYAI	+++
119	ELCDIILRV	+++
121	YLTGYNFTL	+++
122	AISEAQESV	+
123	ALLSAFVQL	++
124	FLGVVVPTV	+++
125	FVAPPTAAV	+++
126	GLSIFIYRL	+++
128	KLFDASPTFFA	++

131	VLIEETDQL	+++
132	VLQDQVDEL	+++
133	ALEELTGFREL	+++
134	ALGRLGILSV	+++
135	ALTGLQFQL	+++
136	FIFGIVHLL	+++
137	FIQQERFFL	+++
138	NLINNIFEL	+
139	FLASPLVAI	+++
140	FLFEDFVEV	+++
141	FLGELTLQL	+++
142	FLYEDSKSVRL	+++
143	TLHAVDVTL	+++
144	GLITQVDKL	+++
145	GLLHEVVSL	+++
146	GLLQQPPAL	+++
147	GLSEYQRNFL	+++
148	ICAGHVPGV	+++
149	ILNPVTTKL	+++
150	ILSEKEYKL	+++
151	ILVKQSPML	+++
152	KIMYTLVSV	+++
153	KLLKGIYAI	+++
154	KLMNIQQQL	+++
155	KLMTSLVKV	+++
156	KMLEDDLKL	+++
157	KVLEFLAKV	+++
158	KVQDVLHQV	+++
159	LLLSDSGFYL	+++
160	LLPPPSPAA	+++
161	NLMLELETV	+++
162	RLADLKVSI	+++
163	SIFDAVLKGV	+++
164	SLFDGAVISTV	+++
165	KLLEEIEFL	++
166	SLFSEVASL	+++
167	SLFSITKSV	+++
168	SLLSPLLSV	+++
169	SSLEENLLHQV	+++

170	STIELSENSL	+++
171	TLLDVISAL	+++
172	TLQDSLEFI	+++
173	VILDSVASV	+++
174	VLVEITDVDFAA	+++
175	VMESILLRL	+++
176	YLHIYESQL	+++
177	YLYEAEEATTL	+++
178	YVLQGEFFL	+++
179	FVDTNLYFL	+++
180	GILQLVESV	++
182	LLPPPPPVA	+
183	VLFETVLTI	+
185	FIAQLNNVEL	+
186	FLDVSRDFV	+
188	GLEDEMYEV	++
189	SLSHLVPAL	+
190	GLIELVDQL	++
191	GLSDISAQV	+++
194	SLAPFDREPFTL	+++
195	ALIPDLNQI	+++
196	TLALAMIYL	++
200	YLLDFEDRL	+
201	YLNISQVNV	++
204	RLCDIVVNV	+++
207	GLVGLLEQA	++
211	FIDDLFAFV	+++
212	FLIGQGAHV	+
213	YINEDEYEV	+
214	FLFDGSMSL	++
215	QLFEEEIEL	+
216	KVVSNLPAI	+++
217	AQFGAVLEV	+
218	ALDQFLEGI	+
219	ALLELENSV	+++
220	FLAEAPTAL	++
221	FLAPDNSLLLA	+++
222	FLIETGTLL	+

224	FLSPLLPLL	+
225	GTYQDVGSLNIGDV	+++
226	GVIDPVPEV	+
227	IIAEGIPEA	+
231	IVMGAIPSV	+
232	KVMEGTVAA	++
233	MLEVHIPSV	++
236	SLFDGFFLTA	+
237	YLDRLIPQA	++
239	VLIDDTVLL	++
242	GILDFZVFL	+
243	GLPDLDIYL	+++
244	ILEPFLPAV	+
246	KLPVPLESV	+
249	VLLESLVEI	+++
252	YLGDLIMAL	+
253	YSDDDVPSV	+++
254	FLYSETWNI	+++
255	GMWNPNAPVFL	+++
256	ALQETPPQV	+++
257	FLQEWEVYA	+++
258	RIYPFLLMV	+++
259	TVLDGLEFKV	+++
260	RLDEAFDFV	++
263	GLMDNEIKV	+++
264	ILTGTPPGV	+++
265	ILWHFVASL	+++
266	QLTEMLPSI	+++
267	SLLETGSDLLL	+++
268	VLFPLPTPL	+++
269	VLQNVAFSV	+++
270	VVVDSDSLAFV	+++
271	YLLDQPVLEQRL	+++
272	KLDHTLSQI	+++
273	AILLPQPPK	+++
274	KLLNLISKL	+++

275	KLMDLEDCAL	+++
276	NMISYVVHL	+++
277	FLIDLNSTHGTFL	+
279	NLAGENILNPL	++
280	SLLNHLPYL	+++
285	SITAVTPLL	+
287	ILMGHSLYM	++
289	SLLAANNLL	+++
290	IASPVIAAV	+++
291	KIIDTAGLSEA	+++
292	KLINSQISL	++
294	KLYGPEGLELV	+
296	FILEPLYKI	++
298	ALTDVILCV	+
299	RLLEEEGVSL	+
302	SLAELDEKISA	+
303	FVWEASHYL	++
305	AMLAQQMQL	+
307	FLLPVAVKL	++
308	SLLDQIPEM	+

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); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE.UU.) .

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 LNH. 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, 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
9	FLLDLDPLL	++
21	ALFKEAYSL	+
25	FLDTSNQHLL	++
30	ILSTLDVEL	++
38	YLTAEILELAGN	++

43	ALLEGVKNV	+
55	ILVEVDLVQA	+
56	GLQDLLFSL	+
61	SLLNKDLSL	+
91	HLSSTTAQV	++
102	SLFAAISGMIL	+++
106	VLYELLQYI	+++
112	FLAILPEEV	++
116	SLLDNLLTI	+
133	ALEELTGFREL	+
135	ALTGLQFQL	+++
142	FLYEDSKSVRL	+++
143	TLHAVDVTL	+++
146	GLLQQPPAL	+
148	ICAGHVPGV	+++
155	KLMTSLVKV	+++
157	KVLEFLAKV	+++
158	KVQDVLHQV	+++
159	LLLSDSGFYL	++
160	LLPPPSPAA	+++
161	NLMLELETV	+++
162	RLADLKVSI	+++
167	SLFSITKSV	+++
170	STIELSENSL	++
174	VLVEITDVDFAA	+
175	VMESILLRL	+++
178	YVLQGEFFL	+++
183	VLFETVLTI	+
192	GMAAEVPKV	+
199	SLNSTTWKV	+++
202	ALAAGGYDV	+++
222	FLIETGTLL	++
225	GTYQDVGSLNIGDV	++
229	ILSPWGAEV	++
238	YQYGAVVTL	++
256	ALQETPPQV	+
260	RLDEAFDFV	++
268	VLFPLPTPL	+
276	NMISYVVHL	+++

294	KLYGPEGLELV	+++
297	ILQNGLETL	+++
298	ALTDVILCV	+++

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 329) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID N.º 330), 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 LNH

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. Los resultados de diez péptidos de la invención se resumen en las Tablas 10A y 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	Secuencia	pocillos
319	SLYKGLLSV	++
320	LLWGNLPEI	++
321	KLLAVIHEL	++
322	TLTNIIHNL	++
323	ILVDWLVQV	++
324	LLYDAVHIV	++

325	FLFVDPELV	+++
326	KLTDVGIATL	++++
327	MLFGHPLLVSV	++
328	ILFPDIIARA	++++

Tabla 10B: 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* correspondientes a péptidos restringidos a HLA-A*02 de la invención. Se indican los resultados de los experimentos de inmunogenicidad llevados a cabo en condiciones *in vitro*. El porcentaje de pocillos y de donantes positivos (entre los evaluables) aparece resumido del modo siguiente: <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 %= +++; >= 70 % = ++++.

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]
1	LLSGQLPTI	"+++"
2	LLSEETPSA	"+"
3	LTIDTQYYL	"+"
5	VLQGLTFTL	"+++"
7	NLLGMIFSM	"++++"
8	ALYAVIEKA	"+"
9	FLLDLDPLL	"++"
12	GLLLLVPLL	"+++"
13	HLVPASWKL	"+++"
17	VIIPLLSSV	"++"
19	VLEAILPLV	"+"
21	ALFKEAYSL	"+"
22	ALKKHLTSV	"++++"
24	AVLGFSFRL	"++++"
25	FLDTSNQHLL	"+"
26	FLGSFIDHV	"+"
27	FLNQESFDL	"+"
28	FLSNANPSL	"++++"
29	ILSDVTQGL	"+"
30	ILSTLDVEL	"++"
33	LLANIVPIAMLV	"+"

35	SLSSERYYL	"++++"
36	VILDIPLLFET	"++"
37	VLGNALEGV	"+"
40	FLNSVIVDL	"+++"
41	ILASIFETV	"+++"
42	YLQDLVERA	"+++"
43	ALLEGVKNV	"++"
44	FIIEEQSFL	"+"
46	FLVEEIFQT	"+"
47	GLLPKLTAL	"++"
51	SLLGNSPVL	"+++"
52	VLLEDVDAAFL	"+"
53	FLREYFERL	"+++"
57	LQIGDFVSV	"++++"
59	RLHREVAQV	"+"
60	SLLIDVITV	"+++"
61	SLLNKDLSL	"+"
62	ALAPYLDLL	"++"
66	KLAPIPVEL	"++"
67	LLATVNVAL	"+"
68	QIAAFLFTV	"+++"
73	YLGEEYPEV	"+"
74	SLDLRPLEV	"++"
253	YSDDDVPSV	"+++"
254	FLYSETWNI	"+"
256	ALQETPPQV	"+"
258	RIYPFLLMV	"++++"
260	RLDEAFDFV	"++++"
261	FLPETRIMTSV	"+"
262	LMGPVVHEV	"++"

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	Secuencia	Intercambio de péptidos
1	LLSGQLPTI	"+++"
2	LLSEETPSA	"+++"
3	LTIDTQYYL	"+++"
4	TLLGFFLAKV	"++"
5	VLQGLTFTL	"+++"
6	TLITLPLLFL	"+++"
7	NLLGMIFSM	"++++"
8	ALYAVIEKA	"+++"
9	FLLDLDPLL	"+++"
10	FLLVGTQIDL	"+++"
11	GLDTVVALL	"+++"
12	GLLLLVPLL	"+++"
13	HLVPASWKL	"+++"
14	LLSDPTPGA	"++"
15	IIIEDLLEA	"++++"
16	TLIAAILYL	"++"
17	VIIPLLSSV	"+++"
18	KLTDQPPLV	"+++"
19	VLEAILPLV	"++++"
21	ALFKEAYSL	"+++"
22	ALKKHLTSV	"+++"
23	ALVEDIINL	"++++"
24	AVLGFSFRL	"+++"
25	FLDTSNQHLL	"+++"
26	FLGSFIDHV	"+++"
27	FLNQESFDL	"+++"
28	FLSNANPSL	"+++"
29	ILSDVTQGL	"+++"
30	ILSTLDVEL	"+++"
31	KLYDEESLL	"++++"
32	VLNEDELPSV	"+++"
33	LLANIVPIAMLV	"++++"
34	LLWEDGVTEA	"+++"
35	SLSSERYYL	"+++"

36	VILDIPLLFET	"+++"
37	VLGNALEGV	"+++"
38	YLTAEILELAGN	"++"
39	QLLPQGIVPAL	"+++"
40	FLNSVIVDL	"++++"
41	ILASIFETV	"++++"
42	YLQDLVERA	"++++"
43	ALLEGVKNV	"+++"
44	FIIEEQSFL	"+++"
45	FILDDSALYL	"+++"
46	FLVEEIFQT	"+++"
47	GLLPKLTAL	"+++"
48	KILDEDLYI	"+++"
49	TILGDPQILL	"++++"
50	LLLDGLIYL	"+++"
51	SLLGNSPVL	"++++"
52	VLLEDVDAAFL	"++++"
53	FLREYFERL	"++++"
54	DIFDAMFSV	"+"
55	ILVEVDLVQA	"++++"
56	GLQDLLFSL	"+++"
57	LQIGDFVSV	"++++"
58	QLAPFLPQL	"+++"
59	RLHREVAQV	"+++"
60	SLLIDVITV	"+++"
61	SLLNKDLSL	"++++"
62	ALAPYLDLL	"++++"
63	ALIEEAYGL	"+++"
64	FLVEVSNDV	"++++"
65	NLTDVSPDL	"+++"
66	KLAPIPVEL	"++++"
67	LLATVNVAL	"++++"
68	QIAAFLFTV	"++++"
69	TLLAFPLLL	"++++"
70	VLIEILQKA	"++++"
71	VLLDYVGNVQL	"++++"
72	TLQEETAVYL	"++"
73	YLGEEYPEV	"+++"
74	SLDLRPLEV	"++++"
75	AALKYIPSV	"+++"
76	ALADLVPVDVVV	"++++"
77	ALLDVSNNYGI	"++++"
78	AMEEAVAQV	"+++"
79	AMKEEKEQL	"++"
80	YLFDEIDQA	"+++"

81	FIFSYITAV	"++"
82	FLIDGSSSV	"+++"
83	FLMDDNMSNTL	"+++"
84	FLQELQLEHA	"+++"
85	GLAPAEVVVATVA	"+++"
86	GLATIRAYL	"+++"
87	GLFARIIMI	"++"
88	GLFDNRSGLPEA	"+++"
89	GLTALHVAV	"+++"
90	HLDEVFLEL	"+++"
91	HLSSTTAQV	"++"
92	KLLFEIASA	"+++"
93	KLLGSLQLL	"++++"
94	LLAGQATTAYF	"+++"
95	LLFDLIPVVSV	"+++"
96	LLLNENESLFL	"+++"
97	LLNFSPGNL	"+"
98	MLQDGIARL	"+++"
99	QLYDGATALFL	"++"
100	RLIRTIAAI	"+++"
101	SLDQSTWNV	"++++"
102	SLFAAISGMIL	"+++"
103	SLQDHLEKV	"+++"
104	VLLGLPLLV	"+++"
105	VLTPVILQV	"+++"
106	VLYELLQYI	"++++"
107	VQAVSIPEV	"+++"
108	YLAPENGYLM	"+++"
109	YLFQFSAAL	"+++"
110	YQYPFVLGL	"++++"
111	YLLDTLLSL	"+++"
112	FLAILPEEV	"+++"
114	GLSDISPST	"++"
115	LLIDIIHFL	"++++"
116	SLLDNLLTI	"+++"
117	VLATILAQL	"++++"
118	VLDGMIYAI	"+++"
119	ELCDIILRV	"+++"
121	YLTGYNFTL	"+++"
122	AISEAQESV	"++"
123	ALLSAFVQL	"+++"
124	FLGVVVPTV	"+++"
125	FVAPPTAAV	"+++"
127	HLMEENMIVYV	"+++"
128	KLFDASPTFFA	"+++"

129	SLFEASQQL	"+++"
130	VIFSYVLGV	"+++"
131	VLIEETDQL	"++"
132	VLQDQVDEL	"++"
133	ALEELTGFREL	"++"
134	ALGRLGILSV	"+++"
135	ALTGLQFQL	"+++"
136	FIFGIVHLL	"+++"
137	FIQQERFFL	"+++"
138	NLINNIFEL	"++++"
139	FLASPLVAI	"++++"
140	FLFEDFVEV	"+++"
141	FLGELTLQL	"+++"
142	FLYEDSKSVRL	"+++"
143	TLHAVDVTL	"+++"
144	GLITQVDKL	"+++"
145	GLLHEVVSL	"+++"
146	GLLQQPPAL	"+++"
147	GLSEYQRNFL	"+++"
148	ICAGHVPGV	"+++"
149	ILNPVTTKL	"+++"
150	ILSEKEYKL	"+++"
151	ILVKQSPML	"+++"
152	KIMYTLVSV	"++"
153	KLLKGIYAI	"+++"
154	KLMNIQQQL	"+++"
155	KLMTSLVKV	"+++"
156	KMLEDDLKL	"+++"
157	KVLEFLAKV	"+++"
158	KVQDVLHQV	"+++"
159	LLLSDSGFYL	"+++"
160	LLPPPSPAA	"+++"
161	NLMLELETV	"+++"
162	RLADLKVSI	"++++"
163	SIFDAVLKGV	"++++"
164	SLFDGAVISTV	"+++"
165	KLLEEIEFL	"+++"
167	SLFSITKSV	"+++"
168	SLLSPLLSV	"+++"
169	SSLEENLLHQV	"+++"
171	TLLDVISAL	"++++"
172	TLQDSLEFI	"++++"
173	VILDSVASV	"++++"
174	VLVEITDVDFAA	"++++"
175	VMESILLRL	"+++"

176	YLHIYESQL	"+++"
177	YLYEAEEATTL	"+++"
178	YVLQGEFFL	"+++"
179	FVDTNLYFL	"+++"
180	GILQLVESV	"+++"
181	LLFDQNDKV	"+++"
182	LLPPPPPVA	"++++"
183	VLFETVLTI	"+++"
184	AVLGTSWQL	"+++"
185	FIAQLNNVEL	"+"
186	FLDVSRDFV	"+++"
187	FLNSFVFKM	"++"
188	GLEDEMYEV	"++"
189	SLSHLVPAL	"+++"
190	GLIELVDQL	"+++"
191	GLSDISAQV	"+++"
192	GMAAEVPKV	"++"
193	SLADSMPSL	"++"
194	SLAPFDREPFTL	"++"
195	ALIPDLNQI	"+++"
197	YLLTDNVVKL	"++"
198	GLLSAVSSV	"+++"
199	SLNSTTWKV	"+++"
200	YLLDFEDRL	"++++"
201	YLNISQVNV	"+++"
202	ALAAGGYDV	"++"
204	RLCDIVVNV	"++"
205	TLFYESPHL	"+++"
206	SAVSGQWEV	"++"
207	GLVGLLEQA	"++++"
208	FLAVSLPLL	"+++"
209	FLLDTISGL	"+++"
210	FLAEQFEFL	"+++"
211	FIDDLFAFV	"+++"
212	FLIGQGAHV	"+++"
213	YINEDEYEV	"++"
214	FLFDGSMSL	"+++"
215	QLFEEEIEL	"++"
216	KVVSNLPAI	"++"
217	AQFGAVLEV	"+++"
218	ALDQFLEGI	"+++"
219	ALLELENSV	"++"
220	FLAEAPTAL	"++"
221	FLAPDNSLLLA	"++++"
222	FLIETGTLL	"+++"

223	FLQDIPDGLFL	"++"
224	FLSPLLPLL	"++"
226	GVIDPVPEV	"++"
227	IIAEGIPEA	"++"
228	IIAEYLSYV	"++"
229	ILSPWGAEV	"++++"
230	IMDDDSYGV	"++"
231	IVMGAIPSV	"+++"
232	KVMEGTVAA	"++"
233	MLEVHIPSV	"+++"
234	NLQRTVVTV	"++"
235	SLDVYELFL	"+++"
236	SLFDGFFLTA	"++++"
237	YLDRLIPQA	"+++"
238	YQYGAVVTL	"+++"
239	VLIDDTVLL	"+++"
240	ALVPTPALFYL	"+++"
241	FIPDFIPAV	"++"
242	GILDFZVFL	"++++"
243	GLPDLDIYL	"++++"
244	ILEPFLPAV	"+++"
245	KLIQLPVVYV	"+++"
246	KLPVPLESV	"+++"
247	KVLEMETTV	"+++"
248	NLLEQFILL	"+++"
249	VLLESLVEI	"++++"
250	VLTNVGAAL	"+++"
251	VLYELFTYI	"+++"
252	YLGDLIMAL	"+++"
253	YSDDDVPSV	"++++"
254	FLYSETWNI	"++++"
255	GMWNPNAPVFL	"++++"
256	ALQETPPQV	"+++"
257	FLQEWEVYA	"++++"
258	RIYPFLLMV	"+++"
259	TVLDGLEFKV	"++++"
260	RLDEAFDFV	"++++"
261	FLPETRIMTSV	"++++"
262	LMGPVVHEV	"++++"
263	GLMDNEIKV	"+++"
264	ILTGTPPGV	"+++"
265	ILWHFVASL	"++++"
266	QLTEMLPSI	"++++"
267	SLLETGSDLLL	"+++"
268	VLFPLPTPL	"++++"

269	VLQNVAFSV	"++++"
270	VVVDSDSLAFV	"++++"
271	YLLDQPVLEQRL	"++++"
272	KLDHTLSQI	"++++"
273	AILLPQPPK	"++"
274	KLLNLISKL	"++++"
275	KLMDLEDCAL	"++++"
276	NMISYVVHL	"++"
277	FLIDLNSTHGTFL	"+++"
278	FLLFINHRL	"+++"
279	NLAGENILNPL	"+++"
280	SLLNHLPYL	"++++"
281	TLQTVPLTTV	"++++"
282	YLLEQGAQV	"++++"
283	ALMPVTPQA	"+++"
284	KLQEQIHRV	"+++"
285	SITAVTPLL	"+++"
286	HLTEDTPKV	"+++"
287	ILMGHSLYM	"++++"
288	RLAPEIVSA	"+++"
289	SLLAANNLL	"++++"
290	IASPVIAAV	"+++"
291	KIIDTAGLSEA	"+++"
292	KLINSQISL	"+++"
293	GLAMVEAISYV	"++++"
294	KLYGPEGLELV	"++++"
295	SLAAVSQQL	"+++"
296	FILEPLYKI	"++++"
297	ILQNGLETL	"+++"
298	ALTDVILCV	"++++"
299	RLLEEEGVSL	"+++"
300	IVLERNPEL	"+++"
301	LQFDGIHVV	"+++"
302	SLAELDEKISA	"+++"
303	FVWEASHYL	"++++"
304	ALIRLDDLFL	"+++"
305	AMLAQQMQL	"+++"
306	AQVALVNEV	"+++"
307	FLLPVAVKL	"+++"
308	SLLDQIPEM	"+++"
309	SLSFVSPSL	"+++"
310	VMAEAPPGV	"+++"
311	YLHRQVAAV	"+++"
314	LIDDKGTIKL	"++"

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

Armitage, J. O., Blood **110** (2007): 29-36

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Inoges, S. et al., Methods Mol.Biol **1139** (2014): 367-387

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

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

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

Li, Y. et al., Cancer Epidemiol. **39** (2015): 8-13

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

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, (6-5-2015), www.cancer.gov

Palomba, M. L., Curr.Oncol Rep. **14** (2012): 433-440

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

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

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

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

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)

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

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

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

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

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

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

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

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

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