P-46722
I32809WOCO-C

Péptidos y combinaciones de péptidos para inmunoterapia contra el cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón amicrocítico 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 y clase II de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales o como dianas para el desarrollo de compuestos y células farmacéutica o inmunológicamente activos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer de pulmón supone la principal causa de muerte por cáncer en los varones y las mujeres. En todo el mundo es el cáncer más importante, tanto en términos de incidencia como de mortalidad. En 2012 se produjeron más de 1,8 millones de casos nuevos (incidencia total del cáncer del 13%) y 1,6 millones de muertes (20% de la mortalidad total por cáncer) a causa del mismo. El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en la población masculina de 87 países y en la femenina de 26 países. Más de un tercio de todos los casos de nuevo diagnóstico se producen en China. Las incidencias más altas se dan en Norteamérica, Europa y el este de Asia (World Cancer Report, 2014).

Desde 1987 mueren cada año más mujeres por el cáncer de pulmón que por el cáncer de mama. La mortalidad en la población masculina ha descendido paulatinamente y de manera sustancial desde 1991-2003,a un ritmo anual del 1,9%. La mortalidad por cáncer de pulmón en la población femenina se está acercando a una fase de estabilización después de experimentar un incremento incesante durante varias décadas. Tales tendencias en la mortalidad por cáncer de pulmón reflejan el descenso del tabaquismo en los últimos 30 años.

Solo en EE.UU. durante 2013 se calcularon en 230.000 los casos nuevos de cáncer de pulmón y en 160.000 los fallecimientos por su causa, según el Instituto Nacional del Cáncer de ese país (NCI).

Históricamente el carcinoma de pulmón microcítico se ha distinguido del carcinoma de pulmón amicrocítico (NSCLC), el cual incluye los tipos histológicos de adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma macrocelular. Con todo, en la pasada década, la distinción entre el adenocarcinoma y el carcinoma epidermoide ha adquirido cada vez mayor relevancia debido a importantes diferencias en la genética y en las respuestas a ciertos tratamientos. Así pues, el cáncer de pulmón comienza a ser clasificado según subtipos moleculares, basándose en ciertas alteraciones genéticas que inician y sostienen la oncogenia pulmonar (Travis et al., 2013).

El pronóstico es en general malo. De todas las personas afectadas por el cáncer de pulmón, solo del 10 al 15% sobreviven cinco años después del diagnóstico. La escasa supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón obedece, al menos en parte, a que al 80% de ellos se les diagnostica la enfermedad en estadio de metástasis y más de la mitad presenta metástasis a distancia (SEER Stat facts, 2014). En el momento de su detección, del 30 al 40% de los casos de cáncer de pulmón amicrocítico se encuentran en el estadio IV, porcentaje que en el de tipo microcítico alcanza el 60%.

La supervivencia relativa a 1 año vista en el cáncer de pulmón ha aumentado ligeramente desde el 35% en 1975-1979 al 44% en 2010, en gran parte gracias a las mejoras de las técnicas quirúrgicas y de los tratamientos combinados. Con todo, la supervivencia a 5 años en todos los estadios combinados ronda apenas el 17%. El

índice de supervivencia alcanza el 54% en aquellos casos que se detectan cuando la enfermedad aún permanece localizada, pero solo el 16% de todos los cánceres de pulmón se diagnostican en ese estadio inicial (SEER Stat facts, 2014).

Las opciones terapéuticas dependen del tipo de cáncer (microcítico o amicrocítico) y del estadio del tumor, e incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y tratamientos biológicos dirigidos como el bevacizumab (AVASTIN®) y el erlotinib (TARCEVA®). En los tumores localizados, la cirugía suele ser el tratamiento de elección. Estudios recientes indican que la supervivencia en el cáncer de pulmón microcítico en estadio inicial mejora con la quimioterapia subsiguiente a la cirugía. Puesto que la enfermedad acostumbra a estar diseminada cuando se la descubre, se suele recurrir a la radioterapia y la quimioterapia, en ocasiones combinadas con la cirugía. La quimioterapia sola o combinada con radiación es el tratamiento de elección habitual para el cáncer de pulmón microcítico; con este régimen, un alto porcentaje de pacientes experimenta remisión, que llega a ser prolongada en ciertos casos con cirugía (S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

El cáncer de pulmón avanzado también ha demostrado ser resistente a la quimioterapia ordinaria. Con todo, los recientes avances han propiciado progresos esperanzadores en los tratamientos que parecen depender de la histología y la genética. El nivel de escrutinio se ejemplifica por los ensayos de quimioterapia adyuvante concebidos para distinguir no ya entre las mutaciones de los codones 12 y 13 de KRAS, sino además entre las diversas sustituciones de aminoácidos que provocan ciertas mutaciones del codón 12 (Shepherd et al., 2013).

Con el propósito de ampliar las opciones terapéuticas para el cáncer de pulmón amicrocítico, se han estudiado o se están estudiando diversas estrategias inmunoterapéuticas. Si bien la vacunación con L-BLP25 o MAGEA3 no ha podido demostrar una ventaja para la supervivencia debida a la vacuna en los pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico, una vacuna derivada de una estirpe celular alogénica ha mostrado resultados alentadores en estudios clínicos. Además, actualmente hay en marcha otros ensayos de vacunación dirigida contra los gangliósidos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico y otros antígenos. Una estrategia alternativa para potenciar la respuesta de los linfocitos T antitumorales del paciente consiste en

bloquear con anticuerpos específicos los receptores inhibidores de dichos linfocitos o sus ligandos. El potencial terapéutico de varios de esos anticuerpos, como ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, MPDL3280A y MEDI-4736, en el cáncer de pulmón amicrocítico es objeto de evaluación en estos momentos en estudios clínicos (Reinmuth et al., 2015)

A la vista de los graves efectos secundarios y del coste que comporta el tratamiento del cáncer, existe la necesidad de descubrir factores que puedan ser usados para el tratamiento del cáncer en general y, en particular, del cáncer de pulmón, incluido el de tipo amicrocítico. Existe asimismo la necesidad de descubrir factores que puedan servir como biomarcadores del cáncer en general y del cáncer de pulmón 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 beta-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-gamma). 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 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 24 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 24, 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 la secuencia de la SEQ ID N.º 24 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 24, 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 20 aminoácidos.

La presente invención preferiblemente hace referencia a un péptido que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 24, y los usos del mismo. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de amino ácidos de

cualquiera de la SEQ ID No. 1 a la SEQ ID No. 23, la SEQ ID No. 25, de la SEQ ID No. 27 a la SEQ ID No. 29, de la SEQ ID No. 31, de la SEQ ID No. 32, de la SEQ ID No. 35 a SEQ ID No. 88, o de la SEQ ID No. 90 a SEQ ID No. 158, o de la SEQ ID No. 161 a la SEQ ID No. 177 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 4 se unen a los alelos HLA-A*02. Todos los péptidos de la Tabla 2 se unen a los alelos HLA-A*24. Todos los péptidos de la Tabla 3 y la Tabla 5 se unen a los alelos HLA-DR. Los péptidos de la Tabla 4 y la Tabla 5 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 6, la Tabla 7 y la Tabla 8son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos de la invención. Los péptidos de la Tabla 9 y la Tabla 10 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	KLLPYIVGV	1293	COL6A3
2	FLIPYAIML	11254	SLC6A14
3	FLYDVVKSL	1293	COL6A3
4	FVFSFPVSV	1846	DUSP4
5	ALTSTLISV	10457	GPNMB
6	SLQGSIMTV	653509, 729238	SFTPA1, SFTPA2
7	NLLQVLEKV	144501	KRT80
8	ALLNILSEV	55236	UBA6
9	ALSGTLSGV	4174	MCM5
10	KMAGIGIREA	3866	KRT15
11	YLNVQVKEL	10051	SMC4
12	IVDRTTTVV	6509	SLC1A4
13	FLFDGSANL	1293	COL6A3
14	LIQDRVAEV	3914	LAMB3

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
15	ELDRTPPEV	23450	SF3B3
16	LIFDLGGGTFDV	3303, 3304, 3305, 3306, 3310, 3311, 3312	HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA6, HSPA7, HSPA8
17	TLLQEQGTKTV	286887, 3852, 3853, 3854	KRT6C, KRT5, KRT6A, KRT6B
18	ILLTEQINL	10745, 57157	PHTF1, PHTF2
19	VLTSDSPAL	10457	GPNMB
20	LMTKEISSV	5591	PRKDC
21	VLSSGLTAA	1459	CSNK2A2
22	NLINQEIML	5783	PTPN13

Tabla 2: Péptidos adicionales conformes a la presente invención

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
23	VYTSWQIPQKF	101060271, 6362	CCL18
24	NYPKSIHSF	4321	MMP12
25	RFMDGHITF	27074	LAMP3
27	RYPPPVREF	1293	COL6A3
28	RYLDSLKAIVF	55839	CENPN
29	YYTKGFALLNF	5352	PLOD2
31	SYLDKVRAL	3858, 3859, 3860, 3861, 3866, 3868, 3872, 3880	KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT19
32	EYQPEMLEKF	1293	COL6A3
35	TYNPEIYVI	3673	ITGA2
36	YYGNTLVEF	25903	OLFML2B
37	RYLEYFEKI	79573	TTC13
38	VFLNRAKAVFF	10457	GPNMB
39	KFLEHTNFEF	1794	DOCK2
40	IYNPSMGVSVL	5818	PVRL1
41	TYIGQGYII	60681	FKBP10
42	VYVTIDENNIL	4363	ABCC1
43	RYTLHINTL	247	ALOX15B
44	IYNQIAELW	27293	SMPDL3B
45	KFLESKGYEF	9945	GFPT2

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
46	NYTNGSFGSNF	1655	DDX5
47	RYISPDQLADL	2023	ENO1
48	YYYGNTLVEF	25903	OLFML2B
49	QYLFPSFETF	3824	KLRD1
50	LYIGWDKHYGF	5685	PSMA4
51	NYLLESPHRF	9842	PLEKHM1
52	SYMEVPTYLNF	7805	LAPTM5
53	IYAGQWNDF	81035	COLEC12
54	AYKDKDISFF	58486	ZBED5
55	IYPVKYTQTF	64065	PERP
56	RYFPTQALNF	291, 292, 293, 83447	SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC25A31
57	SYSIGIANF	1303	COL12A1
58	VYFKPSLTPSGEF	9972	NUP153
59	HYFNTPFQL	160760	PPTC7
60	SYPAKLSFI	4029	L1RE1
61	RYGSPINTF	647024	C6orf132
62	AYKPGALTF	84883	AIFM2
63	LYINKANIW	55632	G2E3
64	VYPLALYGF	9213	XPR1
65	IYQRWKDLL	219285	SAMD9L
66	DYIPQLAKF	2744	GLS
67	IFLDYEAGHLSF	81559	TRIM11
68	RYLFVVDRL	55686	MREG
69	TYAALNSKATF	8826	IQGAP1
70	VYHSYLTIF	7226	TRPM2
71	TYLTNHLRL	90874	ZNF697
72	YYVDKLFNTI	5922	RASA2
73	RYLHVEGGNF	3516	RBPJ
74	EYLPEFLHTF	154664	ABCA13
75	AYPDLNEIYRSF	11262	SP140
76	VYTZIQSRF	8445, 8798	DYRK2, DYRK4
77	RYLEAGAAGLRW	23640	HSPBP1
78	IYTRVTYYL	64499, 7177	TPSB2, TPSAB1
79	RYGGSFAEL	23135	KDM6B

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
80	AYLKEVEQL	8087	FXR1
81	KYIEAIQWI	81501	DCSTAMP
82	FYQGIVQQF	10426	TUBGCP3
83	EYSDVLAKLAF	27245	AHDC1
84	TFDVAPSRLDF	23420, 283820, 408050	NOMO1, NOMO2, NOMO3
85	PFLQASPHF	84985	FAM83A

Tabla 3: Péptidos HLA-DR conformes a la presente invención

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
86	LSADDIRGIQSLYGDPK	4321	MMP12
87	EGDIQQFLITGDPKAAYDY	1301	COL11A1
88	NPVSQVEILKNKPLSVG	3694	ITGB6
90	DAVQMVITEAQKVDTR	3918	LAMC2
91	VARLPIIDLAPVDVGGTD	1290	COL5A2
92	NKPSRLPFLDIAPLDIGGAD	1278	COL1A2
93	SRPQAPITGYRIVYSPSV	2335	FN1

Tabla 4: 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
94	ILVDWLVQV	9133	CCNB2
95	KIIGIMEEV	2956	MSH6
96	AMGIAPPKV	9129	PRPF3
97	TLFPVRLLV	79888	LPCAT1
98	VLYPHEPTAV	29980, 5523	DONSON, PPP2R3A
99	ALFQRPPLI	1736	DKC1
100	KIVDFSYSV	701	BUB1B
101	LLLEILHEI	30001	ERO1L
102	SLLSELQHA	115362	GBP5
103	KLLSDPNYGV	79188	TMEM43
104	SLVAVELEKV	25839	COG4
105	IVAESLQQV	6772	STAT1
106	SILEHQIQV	4173	MCM4

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
107	ALSERAVAV	10213	PSMD14
108	TLLDFINAV	55236	UBA6
109	NLIEVNEEV	221960, 51622	CCZ1B, CCZ1

Tabla 5: Péptidos HLA-DR 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
110	IQLIVQDKESVFSPR	27074	LAMP3

Tabla 6: Otros 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
111	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
112	VLAPLFVYL	2535, 8321, 8324	FZD2, FZD1, FZD7
113	FLLDGSANV	1293	COL6A3
114	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
115	YVYQNNIYL	2191	FAP
116	KIQEMQHFL	4321	MMP12
117	ILIDWLVQV	891	CCNB1
118	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
119	IVDDITYNV	2335	FN1
120	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
121	RLLDSVSRL	3918	LAMC2
122	KLSWDLIYL	51148	CERCAM
123	GLTDNIHLV	25878	MXRA5
124	NLLDLDYEL	1293	COL6A3
125	RLDDLKMTV	3918	LAMC2
126	KLLTEVHAA	101	ADAM8
127	ILFPDIIARA	64110	MAGEF1
128	TLSSIKVEV	25878	MXRA5
129	GLIEIISNA	23020	SNRNP200
130	KILEDVVGV	22974	TPX2

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
131	ALVQDLAKA	891	CCNB1
132	ALFVRLLALA	7045	TGFBI
133	RLASYLDKV	3857, 3858, 3859, 3860, 3861, 3866, 3868, 3872, 3880	KRT9, KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT19
134	TLWYRAPEV	1019,1021	CDK4,CDK6
135	AIDGNNHEV	9945	GFPT2
136	ALVDHTPYL	1462	VCAN
137	FLVDGSWSV	1303	COL12A1
138	ALNEEAGRLLL	27338	UBE2S
139	SLIEDLILL	64754	SMYD3
140	TLYPHTSQV	1462	VCAN
141	NLIEKSIYL	667	DST
142	VLLPVEVATHYL	10568	SLC34A2
143	AIVDKVPSV	22820	COPG1
144	KIFDEILVNA	7153, 7155	TOP2A, TOP2B
145	AMTQLLAGV	3371	TNC
146	FQYDHEAFL	57333, 5954	RCN3, RCN1
147	VLFPNLKTV	646	BNC1
148	ALFGALFLA	5360	PLTP
149	KLVEFDFLGA	10460	TACC3
150	GVLENIFGV	399909	PCNXL3
151	AVVEFLTSV	29102	DROSHA
152	ILQDRLNQV	990	CDC6
153	ALYDSVILL	1734	DIO2
154	ILFEINPKL	154664	ABCA13
155	ALDENLHQL	154664	ABCA13
156	TVAEVIQSV	55083	KIF26B
157	KLFGEKTYL	6317	SERPINB3
158	KLDETNNTL	667	DST

Tabla 7: Otros 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
161	LYQILQGIVF	983	CDK1

Tabla 8: Péptidos HLA-DR útiles para, por ejemplo, tratamientos personalizados contra el cáncer

SEQ ID N.º	Secuencia	ID del gen (s)	Símbolo(s) oficial(es) del gen
162	TNGVIHVVDKLLYPADT	10631	POSTN

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 cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer gástrico, melanoma, carcinoma de células de Merkel, leucemia (LMA, LLC), linfoma no hodgkiniano (LNH), cáncer de esófago incluido el cáncer de la unión gastroesofágica, cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria y cáncer de útero.

Se prefiere especialmente al péptido –solo o en combinación– conforme con la presente invención que comprende la SEQ ID N.º 24. Se prefiere más al péptido –solo o combinado –que comprende la SEQ ID N° 24 (véase la Tabla 2), y sus usos en la inmunoterapia del cáncer de pulmón (incluido el amicrocítico), cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer gástrico, melanoma, carcinoma de células de Merkel, leucemia (LMA, LLC), linfoma no hodgkiniano (LNH), cáncer de esófago incluido el cáncer de la unión gastroesofágica (OSCAR), cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma (GBC_CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC) y cáncer de útero (UEC), pero preferiblemente el cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC).

Tal y como se muestra a continuación en la Tabla 9, 9-2 y la Tabla 10 y 10-2, muchos de los péptidos acordes con la presente invención también se encuentran en otros tipos de tumores y, por tanto, también pueden formar parte de la inmunoterapia para otras indicaciones. Véase también la Figura 1 y el ejemplo 1.

Tabla 9: Péptidos HLA-A*02 acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas. La tabla expone los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumores adicionales bien sobrepresentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente entre las medias geométricas del tejido tumoral y del tejido normal superior a 3.

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
1	KLLPYIVGV	Páncreas, Mama
2	FLIPYAIML	Estómago, Colon, Recto, Páncreas
3	FLYDVVKSL	Páncreas, Mama
4	FVFSFPVSV	Estómago, Páncreas, Mama, Melanoma, Ovario
5	ALTSTLISV	Mama, Melanoma, Esófago
7	NLLQVLEKV	Riñón, Colon, Recto, Hígado, Mama
8	ALLNILSEV	Cerebro, Hígado, Próstata, Ovario
9	ALSGTLSGV	Cerebro, Hígado, Leucocitos, Melanoma, Ovario, Esófago
10	KMAGIGIREA	Próstata, Ovario
11	YLNVQVKEL	Colon, Recto, Hígado
13	FLFDGSANL	Colon, Recto, Páncreas, Mama, Esófago
14	LIQDRVAEV	Riñón
15	ELDRTPPEV	Riñón, Cerebro, Hígado, Leucocitos
16	LIFDLGGGTFDV	Cerebro, Hígado, Próstata, Mama, Melanoma, Ovario
18	ILLTEQINL	Riñón, Estómago, Hígado, Páncreas, Próstata, Mama, Ovario, Esófago
19	VLTSDSPAL	Hígado, Melanoma, Esófago
20	LMTKEISSV	Cerebro, Hígado, Melanoma
21	VLSSGLTAA	Hígado, Esófago
94	ILVDWLVQV	Riñón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Melanoma, Ovario
95	KIIGIMEEV	Riñón, CCM, Esófago

96	AMGIAPPKV	Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Leucocitos
97	TLFPVRLLV	Riñón, Leucocitos
98	VLYPHEPTAV	Riñón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, CCM, Melanoma, Ovario
99	ALFQRPPLI	Colon, Recto, Hígado, Ovario
100	KIVDFSYSV	Cerebro, Colon, Recto, CCM, Ovario
101	LLLEILHEI	Riñón, Hígado, Páncreas, Mama, Ovario
102	SLLSELQHA	Riñón, Mama, Ovario, Esófago
103	KLLSDPNYGV	Cerebro, Páncreas
104	SLVAVELEKV	Cerebro, Hígado, Páncreas, CCM, Ovario, Esófago
105	IVAESLQQV	Riñón, Estómago, Páncreas, Mama, Ovario, Esófago
106	SILEHQIQV	Riñón
111	SLYKGLLSV	Riñón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Ovario
112	VLAPLFVYL	Riñón, Páncreas, Mama, Melanoma
113	FLLDGSANV	Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Mama, Ovario, Esófago
114	AMSSKFFLV	Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Próstata, Ovario, Esófago
115	YVYQNNIYL	Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Mama, Melanoma, Ovario, Esófago
116	KIQEMQHFL	Colon, Recto
117	ILIDWLVQV	Riñón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Melanoma, Ovario
118	SLHFLILYV	Riñón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Melanoma, Ovario
119	IVDDITYNV	Hígado, Páncreas, Mama, Esófago
120	KIQEILTQV	Riñón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Leucocitos, Ovario, Esófago
121	RLLDSVSRL	Riñón, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Ovario
122	KLSWDLIYL	Riñón, Colon, Recto
123	GLTDNIHLV	Riñón, Colon, Recto, Páncreas, Ovario, Esófago

124	NLLDLDYEL	Estómago, Colon, Recto, Páncreas, Mama, Ovario, Esófago
125	RLDDLKMTV	Colon, Recto, Páncreas, Ovario, Esófago
126	KLLTEVHAA	Riñón, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Mama, Ovario
127	ILFPDIIARA	Riñón, Cerebro, Leucocitos, Esófago
128	TLSSIKVEV	Riñón, Estómago, Colon, Recto, Páncreas, Próstata, Mama, Melanoma, Ovario
129	GLIEIISNA	Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Ovario, Esófago
130	KILEDVVGV	Riñón, Estómago, Colon, Recto, Melanoma, Ovario, Esófago
131	ALVQDLAKA	Riñón, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Ovario
132	ALFVRLLALA	Riñón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Melanoma, Ovario, Esófago
133	RLASYLDKV	Páncreas, Mama, Esófago
134	TLWYRAPEV	Estómago, Melanoma, Ovario
135	AIDGNNHEV	Cerebro, Hígado, Páncreas
136	ALVDHTPYL	Riñón, Hígado, Páncreas
137	FLVDGSWSV	Estómago, Colon, Recto, Páncreas, Ovario, Esófago
138	ALNEEAGRLLL	Riñón, Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, CCM, Melanoma, Ovario, Esófago
139	SLIEDLILL	Riñón, Cerebro, Colon, Recto, Hígado, Páncreas, Próstata, Melanoma, Ovario, Esófago
141	NLIEKSIYL	Esófago
142	VLLPVEVATHYL	Ovario
143	AIVDKVPSV	Riñón, Hígado, Páncreas, Próstata, Ovario, Esófago
144	KIFDEILVNA	Estómago, Colon, Recto, Melanoma, Ovario, Esófago
145	AMTQLLAGV	Cerebro, Colon, Recto, Mama, Esófago
146	FQYDHEAFL	Riñón, Estómago, Colon, Recto, Páncreas, Melanoma, Esófago

147	VLFPNLKTV	Riñón
148	ALFGALFLA	Melanoma, Ovario
149	KLVEFDFLGA	Cerebro, Estómago, Colon, Recto, Hígado, CCM, Ovario, Esófago
150	GVLENIFGV	Riñón, Cerebro, Hígado, Ovario, Esófago
151	AVVEFLTSV	Cerebro, CCM, Esófago
152	ILQDRLNQV	Colon, Recto, Hígado, Ovario
153	ALYDSVILL	Estómago, Próstata, Esófago
155	ALDENLHQL	Esófago
156	TVAEVIQSV	Páncreas, Mama, Esófago
157	KLFGEKTYL	Esófago

Tabla 9-2: Péptidos HLA-A*02 acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas (enmienda de la Tabla 9). La tabla expone, como la Tabla 9, los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumores adicionales bien sobrepresentados (incluida la presentación específica) en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente entre las medias geométricas del tejido tumoral y del tejido normal superior a 3. La sobrepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal que muestra la presentación más elevada. Los tejidos normales con los que se ha contrastado la sobrepresentación son los siguientes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, células sanguíneas, vaso sanguíneo, médula ósea, encéfalo, cartílago, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroides, peritoneo, hipófisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroides, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
1	KLLPYIVGV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
2	FLIPYAIML	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
3	FLYDVVKSL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
4	FVFSFPVSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hogdkiniano
7	NLLQVLEKV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
8	ALLNILSEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
9	ALSGTLSGV	Leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
10	KMAGIGIREA	Cáncer de vejiga urinaria
11	YLNVQVKEL	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma mieloide aguda
13	FLFDGSANL	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
14	LIQDRVAEV	Cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria
15	ELDRTPPEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de páncreas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
17	TLLQEQGTKTV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
18	ILLTEQINL	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
20	LMTKEISSV	Cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar
21	VLSSGLTAA	Cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
22	NLINQEIML	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria
94	ILVDWLVQV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
95	KIIGIMEEV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, melanoma, linfoma mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
96	AMGIAPPKV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, linfoma no hogdkiniano
98	VLYPHEPTAV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no hogdkiniano
99	ALFQRPPLI	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hogdkiniano
100	KIVDFSYSV	Cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero
101	LLLEILHEI	Cáncer de pulmón microcítico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de vejiga urinaria
102	SLLSELQHA	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar, linfoma no hogdkiniano
103	KLLSDPNYGV	Cáncer de mama, melanoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
105	IVAESLQQV	Cáncer de pulmón microcítico, melanoma, linfoma no hogdkiniano
106	SILEHQIQV	cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, linfoma mieloide aguda, linfoma no hogdkiniano
107	ALSERAVAV	Cáncer de esófago, cáncer de útero
108	TLLDFINAV	Linfoma no hogdkiniano
109	NLIEVNEEV	Leucemia linfocítica crónica, linfoma mieloide aguda

Tabla 10: Péptidos HLA-A*24 acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas. La tabla expone los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumores adicionales bien sobrepresentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente entre las medias geométricas del tejido tumoral y del tejido normal superior a 3.

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
27	RYPPPVREF	Hígado, Próstata
28	RYLDSLKAIVF	Riñón, Hígado
29	YYTKGFALLNF	Riñón, Cerebro, Hígado
31	SYLDKVRAL	Estómago
36	YYGNTLVEF	Cerebro, Estómago
37	RYLEYFEKI	Cerebro, Hígado, Próstata
38	VFLNRAKAVFF	Hígado
39	KFLEHTNFEF	Hígado
41	TYIGQGYII	Cerebro, Estómago, Hígado, Próstata
42	VYVTIDENNIL	Riñón, Estómago
43	RYTLHINTL	Próstata
44	IYNQIAELW	Estómago, Hígado
45	KFLESKGYEF	Cerebro
46	NYTNGSFGSNF	Hígado
47	RYISPDQLADL	Riñón
49	QYLFPSFETF	Estómago
50	LYIGWDKHYGF	Riñón, Estómago, Hígado
51	NYLLESPHRF	Hígado

SEQ ID N.º	Secuencia	Otros órganos o enfermedades relevantes
52	SYMEVPTYLNF	Hígado
53	IYAGQWNDF	Próstata
54	AYKDKDISFF	Riñón, Cerebro
56	RYFPTQALNF	Riñón, Estómago, Hígado
58	VYFKPSLTPSGEF	Estómago, Hígado
59	HYFNTPFQL	Riñón, Cerebro, Hígado, Próstata
60	SYPAKLSFI	Hígado
61	RYGSPINTF	Hígado, Próstata
62	AYKPGALTF	Hígado
63	LYINKANIW	Estómago, Hígado
66	DYIPQLAKF	Riñón, Hígado
67	IFLDYEAGHLSF	Riñón, Estómago, Hígado, Próstata
69	TYAALNSKATF	Hígado
70	VYHSYLTIF	Cerebro, Hígado
71	TYLTNHLRL	Hígado
72	YYVDKLFNTI	Hígado, Próstata
73	RYLHVEGGNF	Cerebro, Hígado
75	AYPDLNEIYRSF	Hígado
76	VYTZIQSRF	Hígado, Próstata
77	RYLEAGAAGLRW	Estómago, Hígado
78	IYTRVTYYL	Estómago, Próstata
79	RYGGSFAEL	Cerebro, Hígado
80	AYLKEVEQL	Cerebro, Próstata
81	KYIEAIQWI	Hígado
82	FYQGIVQQF	Cerebro, Hígado, Próstata
84	TFDVAPSRLDF	Hígado, Próstata
85	PFLQASPHF	Estómago
161	LYQILQGIVF	Riñón, Estómago, Hígado

Tabla 10-2: Péptidos HLA-A*24 acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otras enfermedades cancerosas (enmienda de la Tabla 10). La tabla expone, como la Tabla 10, los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumores adicionales bien sobrepresentados (incluida la presentación específica) en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente entre las medias geométricas del tejido tumoral y del tejido normal superior a 3. La sobrepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal que muestra la presentación más elevada. Los tejidos normales con los que se ha contrastado la sobrepresentación son los siguientes: glándula suprarrenal,

arteria, encéfalo, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, páncreas, hipófisis, piel, bazo, estómago y timo.

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
27	RYPPPVREF	Cáncer de cerebro
32	EYQPEMLEKF	Cáncer de cerebro
40	IYNPSMGVSVL	Cáncer de cerebro
46	NYTNGSFGSNF	Cáncer de cerebro
47	RYISPDQLADL	Cáncer de hígado
48	YYYGNTLVEF	Cáncer de cerebro
57	SYSIGIANF	Cáncer de cerebro
61	RYGSPINTF	Cáncer de estómago
67	IFLDYEAGHLSF	Cáncer de cerebro
72	YYVDKLFNTI	Cáncer de cerebro
76	VYTZIQSRF	Cáncer de cerebro

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los péptidos acordes con la presente invención para –preferiblemente combinados- el tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada entre el grupo de cáncer de pulmón (incluido el de tipo amicrocítico), cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer gástrico, melanoma, carcinoma de células de Merkel, leucemia (LMA, LLC).

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, al péptido acorde con la presente invención en que dicho péptido consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 24.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 24 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

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

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

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

Preferiblemente, dicho medicamento servirá como terapia celular, como vacuna o como proteína basada en un TCR soluble o un anticuerpo. Preferiblemente, dicho medicamento es una terapia celular, una vacuna o una proteína derivada de un TCR soluble o un anticuerpo, por ejemplo, un TCR soluble que comprende un anticuerpo anti-CD3 o una parte del mismo.

La presente invención concierne, además, al uso acorde con la presente invención, en que dichas células tumorales son de cáncer de pulmón (incluido el de tipo amicrocítico), cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer gástrico, melanoma, carcinoma de células de Merkel, leucemia (LMA, LLC), linfoma no hodgkiniano (LNH), cáncer de esófago incluido el cáncer de unión gastroesofágica, cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma,

cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, pero preferiblemente células de cáncer de pulmón.

La presente invención se refiere, además, a biomarcadores basados en los péptidos acordes con la presente invención, aquí denominados “dianas”, que pueden ser utilizados para el diagnóstico del cáncer, preferiblemente del cáncer de pulmón (incluido el de tipo amicrocítico). 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.

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

El COL6A3 codifica la cadena alfa-3, una de las tres cadenas alfa del colágeno de tipo VI. Los dominios de esta proteína se unen a proteínas de la matriz extracelular, una interacción que explica la importancia de este colágeno en la organización de los componentes de la matriz. La remodelación de la matriz extracelular a través de la sobreexpresión del colágeno VI contribuye a la resistencia contra el cisplatino en células de cáncer de ovario. La presencia de colágeno VI apareció correlacionada con el grado del tumor, un factor pronóstico en el cáncer de ovario (Sherman-Baust et al., 2003). La COL6A3 se sobreexpresa en el tumor colorrectal (Smith et al., 2009a), el carcinoma de glándulas salivales (Leivo et al., 2005) y se expresa diferencialmente en el cáncer gástrico. El COL6A3 ha sido identificado como uno de siete genes con variantes de corte y empalme específicas de tumor. Las alteraciones de corte y empalme específicas de tumor que han sido validadas han demostrado ser muy

constantes, lo cual ha permitido la distinción clara entre muestras normales y cancerosas y, en algunos casos, incluso entre distintos estadios tumorales (Thorsen et al., 2008).

Familia de transportadores de solutos 6 (transportador de aminoácidos), miembro 14 (SLC6A14)

El SLC6A14 codifica el miembro 14 de la familia de los transportadores de solutos 6 (SLC6A14). El SLC6A14 es un transportador de aminoácidos que pertenece a la familia de los transportadores de solutos 6. Los miembros de esta familia son transportadores de aminoácidos/neurotransmisores dependientes del sodio y del cloruro. El SLC6A14 transporta aminoácidos neutros y catiónicos. El transportador se expresa poco en los tejidos normales (Sloan and Mager, 1999). En cambio, se ha demostrado que el SLC6A14 aparece regulado al alza en tejidos y estirpes celulares del cáncer de cuello uterino (Gupta et al., 2006), colorrectal (Gupta et al., 2005) y en el cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos (RE) (Karunakaran et al., 2011), así como en células de hepatoma (Fuchs et al., 2004). Si bien el SLC6A14 se expresa mínimamente en los tejidos y células normales correspondientes, en las células tumorales aparece regulado al alza para satisfacer su elevada demanda de tales aminoácidos. El alfa-metil-DL-triptófano (alfa-MT), un bloqueador selectivo del SLC6A14, privó de aminoácidos y precipitó la apoptosis en estirpes de células de cáncer de mama positivo para el RE (Karunakaran et al., 2011).

Fosfatasa de doble especificidad 4 (DUSP4)

La proteína codificada por el gen DUSP4 pertenece a la familia de la fosfatasa de proteínas de doble especificidad. DUSP4 inactiva las cinasas ERK1, ERK2 y JNK, se expresa en tejidos diversos y está radicada en el núcleo. Se ha descrito que DUSP4 (alias MKP2) aparece sobreexpresada en muestras de cáncer de mama maligno con respecto a otras muestras similares de tipo no maligno (Wang et al., 2003). El estudio de conjuntos de datos procedentes de micromatrices obtenidas en pacientes con cáncer colorrectal ha revelado la expresión diferencial del DUSP4, con la expresión máxima en los tumores con BRAF mutado. Asimismo, los niveles elevados de DUSP4 aparecieron relacionados con una peor supervivencia global (De, V et al., 2013).

Glucoproteína (transmembrana) nmb (GPNMB)

El gen GPNMB codifica una glucoproteína transmembrana de tipo I. La GPNMB se ha hallado expresada en un gran abanico de tipos de cáncer donde aumenta básicamente la malignidad del tumor al promover la migración y la invasión de las células tumorales y la formación de metástasis. A escala molecular se ha evidenciado que la GPNMB aumenta la expresión de las MMP-2, 3 y 9 y que ella misma está regulada por la p53 (Metz et al., 2005; Metz et al., 2007; Rose et al., 2007; Fiorentini et al., 2014). Los niveles elevados de GPNMB se correlacionan además con una menor supervivencia global en el cáncer de pulmón microcítico, el glioblastoma y el carcinoma renal de células claras (Qin et al., 2014; Li et al., 2014; Kuan et al., 2006).

Queratina, citoesquelética de tipo II 80 (KRT80)

El KRT80 codifica la queratina 80 (KRT80). La KRT80 se ha hallado en casi todos los tipos de epitelio y está relacionada con la diferenciación celular o tisular avanzada. En los márgenes de la célula cercanos a las placas desmosómicas radican filamentos intermedios que contienen KRT80, y ésta solo adopta una distribución citoplasmática en las células que están iniciando la diferenciación terminal (Langbein et al., 2010).

Proteína 4 para el mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC4)

La proteína SMC4 es un componente central del complejo de la condensina que interviene en la condensación de la cromatina y también ha sido vinculada con la segregación de los nucléolos, la reparación del ADN y el mantenimiento de la estructura de la cromatina (Cervantes et al., 2006).

Familia de transportadores de solutos 1 (transportador de glutamato/aminoácidos neutros), miembro 4 (SLC1A4)

El SLC1A4 es un transportador de aminoácidos que interviene en el intercambio dependiente de sodio de los aminoácidos neutros pequeños (revisado en (Kanai et al., 2013)). Se ha descrito que el SLC1A4 se expresa notablemente más en los adenocarcinomas de esófago que en los carcinomas epidermoides (Younes et al., 2000). La expresión del SLC1A4 en las células de cáncer de próstata parece aumentar como respuesta al tratamiento contra los andrógenos (Wang et al., 2013a).

Queratina 5 (KRT5), Queratina 6A (KRT6A), Queratina 6B (KRT6B) y Queratina 6C (KRT6C)

Las KRT5, KRT6A, KRT6B y KRT6C son queratinas homólogas que forman parte de las proteínas de los filamentos intermedios. Las queratinas son ampliamente usadas como proteínas marcadoras en el diagnóstico tumoral, porque su patrón de expresión depende del tejido originario de la neoplasia maligna (revisión en (Karantza, 2011)). En circunstancias normales, la KRT6A y la KRT6B inhiben aparentemente la migración celular a través del secuestro y, por ende, la inhibición de la actividad de la cinasa Src pro-migratoria. No se ha investigado si este mecanismo también impera en las células cancerosas (Rotty and Coulombe, 2012). La tinción de las KRT5/6 ha sido propuesta como uno de los diversos marcadores que serviría para distinguir el adenocarcinoma poco diferenciado del carcinoma epidermoide en el cáncer de pulmón amicrocítico (Zhao et al., 2014b; Xu et al., 2014). Los tumores neuroendocrinos pulmonares también son negativos para las KRT5/6 (Zhang et al., 2014).

Ligando de quimiocina (motivo C-C) 18 (pulmonar y regulado por activación (CCL18)
Este gen antimicrobiano es uno de los diversos genes de citocina Cys-Cys (CC) que se agrupan en el brazo q del cromosoma 17. La citocina codificada por este gen presenta actividad quimiotáctica para con los linfocitos T vírgenes, los linfocitos T CD4+ y CD8+ y los linfocitos no activados, pero no con los monocitos ni los granulocitos. En el contexto del cáncer se ha descrito la regulación al alza del CCL18 tanto en el tejido tumoral como en la sangre, por lo que su concentración en suero se ha propuesto como biomarcador en diversos tipos de tumores. En múltiples casos se ha evidenciado una correlación con los estadios tumorales avanzados y un pronóstico malo (entre otros en el cáncer gástrico (Wu et al., 2013a), cáncer de mama (Chen et al., 2011; Narita et al., 2011), cáncer de próstata (Chen et al., 2014) y cáncer vesical (Urquidi et al., 2012)). Los niveles en suero del CCL18 aparecieron elevados en pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico con respecto a controles sanos. Asimismo, los niveles elevados en suero predijeron un menor tiempo de supervivencia en pacientes con adenocarcinoma (Plones et al., 2012). El CCL18 forma parte del panel de biomarcadores séricos de 12 proteínas propuesto para la identificación del cáncer de pulmón amicrocítico (Ostroff et al., 2010).

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

La MMP12, también llamada metaloelastasa humana (HME) o metaloelastasa de macrófago (MME) es una endopeptidasa con cinc reconocida por su capacidad para degradar la elastina. Aparte de eso, interacciona con una amplia variedad de sustratos, que abarcan otras proteínas de la matriz, como colágenos, fibronectina, laminina o proteoglucanos, así como otras ajenas a la misma, como la alfa-1-antitripsina. En el asma, el enfisema y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la MMP12 podría contribuir a la destrucción de los alveolos y a la remodelación de las vías aéreas (Cataldo et al., 2003; Wallace et al., 2008). La MMP12 ha sido implicada en la migración de los macrófagos, y puesto que puede generar angiostatina a partir del plasminógeno, contribuye a la inhibición de la angiogenia (Chakraborti et al., 2003; Chandler et al., 1996; Sang, 1998). A semejanza de otras metaloproteinasas, la MMP12 interviene en procesos fisiológicos como la embriogenia, la cicatrización de las heridas y el ciclo menstrual (Chakraborti et al., 2003; Labied et al., 2009), pero también en procesos patológicos de destrucción tisular. Pese a que los datos proceden de un reducido número de pacientes en varios casos, la bibliografía ofrece amplias evidencias de que la MMP12 aparece sobreexpresada con frecuencia en el cáncer (Denys et al., 2004; Hagemann et al., 2001; Ma et al., 2009; Vazquez-Ortiz et al., 2005; Ye et al., 2008). Con todo, existe controversia con respecto a la repercusión de dicha sobreexpresión en los parámetros clínicos y en el pronóstico. Pues si bien podría estar implicada en la disolución de la matriz y, por tanto, en la metástasis, también inhibiría el crecimiento tumoral mediante la producción de angiostatina, que influye negativamente en la angiogenia (Gorrin-Rivas et al., 2000; Gorrin Rivas et al., 1998; Kim et al., 2004). En el cáncer de pulmón, las consecuencias de la expresión de la MMP12 son controvertidas. Se ha descrito su sobreexpresión por parte de las células epiteliales en la remodelación del pulmón desatada por la inflamación. Y tal vez su regulación al alza intervenga en la transición del enfisema al cáncer de pulmón (Qu et al., 2009). Estudios con animales sugieren que la expresión de la MMP12 en el estroma o en los macrófagos suprime el crecimiento de los tumores pulmonares (Acuff et al., 2006; Houghton et al., 2006). No obstante, también se ha descrito que su sobreexpresión en los tumores de pulmón se halla relacionada con la recurrencia, la metastatización y una supervivencia sin recidiva más breve tras la extirpación quirúrgica (Cho et al., 2004; Hofmann et al., 2005).

Proteína de membrana asociada a los lisosomas 3 (LAMP3)

La LAMP3 es una proteína transmembrana de tipo I presente en el compartimiento lisosómico, dotada de un pequeño dominio citoplasmático y un dominio luminal fuertemente glucosilado (Wilke et al., 2012). Si bien se ha descrito la regulación al alza de LAMP3 en diversos tipos de cáncer, aún no se ha demostrado su expresión en las mismas células tumorales. En el margen del tumor invasivo se han detectado células dendríticas LAMP3(+) agrupadas con linfocitos T proliferativos, por lo que se ha propuesto que sería un reflejo de la respuesta inmunitaria antitumoral contra, entre otros, el carcinoma de células renales (Middel et al., 2010), el carcinoma epidermoide de esófago (Liu et al., 2010), el carcinoma colorrectal (Yuan et al., 2008; Sandel et al., 2005) o el melanoma (Ladanyi et al., 2007). Un metanálisis de datos transcriptómicos sugiere que los bajos niveles de expresión de LAMP3 en el cáncer de pulmón podrían estar relacionados con una supervivencia global más corta (Lindskog et al., 2014).

Proteína centromérica N (CENPN)

La proteína codificada por el gen CENPN forma parte del complejo asociado al nucleosoma y es importante en el montaje del cinetocoro. La CENPN reconoce una variante centromérica de las histonas (CENP-A), por lo que es necesaria para definir el sitio de reclutamiento de muchas otras proteínas centroméricas (Carroll et al., 2009). La eliminación de la CENPN y de otras proteínas del complejo asociado al nucleosoma (NAC) no altera la formación del huso bipolar pero provoca defectos en la condensación cromosómica (McClelland et al., 2007). La CENPN, junto con otras proteínas del NAC, es reclutada en las roturas bicatenarias del ADN, por lo que se ha planteado la posible intervención de este complejo en la reparación del ADN (Zeitlin et al., 2009).

Procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2 (PLOD2)

La proteína codificada por este gen es una enzima homodimérica fijada a la membrana que radica en las cisternas del retículo endoplasmático rugoso. Ciertas mutaciones en la región codificante de este gen están asociadas con el síndrome de Bruck. Se ha descrito la regulación al alza de PLOD2 en el cáncer colorrectal (Nicastri et al., 2014), el mieloma múltiple (Slany et al., 2014) y el cáncer de cuello uterino (Rajkumar et al., 2011), y ha sido relacionado con la formación de metástasis óseas (Blanco et al.,

2012). Se ha observado una correlación entre la expresión elevada de PLOD2 y el pronóstico negativo en el glioblastoma (Dong et al., 2005) así como en el cáncer de mama (Gilkes et al., 2013) y el carcinoma hepatocelular, donde también ha sido asociada con el aumento del tamaño tumoral y la formación de metástasis intrahepáticas (Noda et al., 2012).

Metalopeptidasa de matriz 1 (MMP1)

La MMP1 forma parte de la familia de las metalopeptidasas de la matriz (MMP). En general, las MMP desempeñan un papel esencial en la regulación de la función y la remodelación vascular y la angiogenia. Por medio de la degradación de la matriz extracelular y de otras moléculas extracelulares, facilitan la migración y la invasión de las células endoteliales y de los miocitos lisos vasculares, e influyen en la proliferación y la apoptosis de las células vasculares (Chen et al., 2013). La sobreexpresión de la MMP1 ha sido descrita en varios tipos de cáncer y ha sido vinculada con la angiogenia, la invasión y una supervivencia negativa. Por ejemplo, se ha atribuido a los niveles altos de MMP1 el papel de factor independiente de la supervivencia en el cáncer de colon (Langenskiold et al., 2013), y la expresión de la MMP1 en el tumor y en su estroma está asociada con la progresión tumoral y el pronóstico negativo en el cáncer de mama (Bostrom et al., 2011). Los niveles de MMP1 se han visto elevados tanto en el plasma como en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón y se han vinculado con el estadio avanzado y con la reducción de la supervivencia (Li et al., 2010b). Un metanálisis ha confirmado la relación del polimorfismo 1607 1G/2G de la MMP1 con el incremento del riesgo de cáncer de pulmón (Xiao et al., 2012).

Queratina 10 (KRT10), Queratina 12 (KRT12), Queratina 13 (KRT13), Queratina 14 (KRT14), Queratina 15 (KRT15), Queratina 16 (KRT16), Queratina 17 (KRT17), Queratina 19 (KRT19)

Las queratinas homólogas KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17 y KRT19 son proteínas que forman parte de los filamentos intermedios. Algunas de esas queratinas han sido relacionadas con propiedades citoblásticas, como la KRT14 que se considera un marcador de citoblastos tumorales (Hatina and Schulz, 2012; Schalken and van, 2003). La KRT15 se usa como marcador para la identificación y la vectorización de los citoblastos epidérmicos (Adhikary et al., 2013; Troy et al., 2011), y la KRT17 se expresa en citoblastos situados en la capa basal del bulbo piloso

(Bragulla and Homberger, 2009). Los patrones de expresión de las diferentes queratinas han sido analizados en varios tipos de cáncer, y se ha descrito tanto su regulación al alza como a la baja. Por ejemplo, los niveles elevados de KRT17 se han vinculado con el pronóstico negativo (Wang et al., 2013b; Escobar-Hoyos et al., 2014) y el estadio avanzado (Kim et al., 2012). En lo que respecta a la KRT13, la mayoría de estudios parecen apuntar a su regulación a la baja en el tejido canceroso (Hourihan et al., 2003; Ida-Yonemochi et al., 2012), y al reemplazo de su expresión por la de la KRT17 durante la transformación de las células epidermoides (Mikami et al., 2011). En el caso de la KRT10 y la KRT15, en diferentes estudios se ha demostrado tanto la regulación al alza como a la baja en el cáncer. La sobreexpresión de la KRT19 ha sido descrita recurrentemente en numerosos tipos de cáncer, que ha sido relacionada con la metástasis y la supervivencia negativa (Zong et al., 2012; Lee et al., 2012). La KRT12 se expresa en los epitelios de la córnea. La córnea muestra la regulación a la baja de la queratina 12, que se considera un marcador de la diferenciación (Zhang et al., 2010b).

Mucina 16, asociada a la superficie celular (MUC16)

La MUC16 es la mayor de las mucinas de membrana. La MUC16 es una proteína transmembrana de un solo paso dotada de un dominio extracelular fuertemente glucosilado. La MUC16 es un antígeno asociado a tumor que es escindido de la superficie de las células del cáncer de ovario y acaba en el torrente sanguíneo, por lo que es un biomarcador consolidado para la vigilancia del crecimiento de ese cáncer (Bafna et al., 2010). Se ha demostrado que los niveles de expresión de la MUC16 aparecen elevados en el carcinoma epidermoide de pulmón (Wang et al., 2014). Asimismo, la presencia de niveles elevados en suero se ha relacionado con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico (Yu et al., 2013; Cedres et al., 2011). Combinada con otros biomarcadores, la MUC16 podría formar parte de una firma de expresión génica para subtipos de cáncer de pulmón (Li et al., 2012).

Integrina, alfa 2 (CD49B, subunidad alfa 2 del receptor VLA-2) (ITGA2)

El ITGA2 codifica la subunidad alfa de un receptor transmembrana de los colágenos y proteínas afines. Un escaso número de estudios han descrito la desregulación de la ITGA2 en el cáncer, con indicios tanto de niveles elevados como reducidos: En el adenocarcinoma ductal de páncreas, el ITGA2 apareció hipometilado y

sobreexpresado, y la expresión al alza se vinculó con una supervivencia más breve (Nones et al., 2014). En cambio, en el carcinoma prostático se ha observado su regulación a la baja (Shaikhibrahim et al., 2011). La expresión reducida de la ITGA2 se ha vinculado con la formación de metástasis y peor supervivencia en el cáncer de mama y en el de próstata (Ramirez et al., 2011).

Proteína similar a olfactomedina 2B (OLFML2B)

La OLFML2B pertenece a la familia proteica de las olfactomedinas, glucoproteínas extracelulares implicadas principalmente en la diferenciación de los cilios quimiosensoriales, la neurogenia inicial, la dorsalización de los tubos neurales, la señalización neuromuscular, la exocitosis de las vesículas sinápticas y la patogenia del glaucoma. Los transcritos del OLFMB2 se detectan en diversos tejidos del ratón, como el pulmón, el estómago y la próstata, pero no en el hígado (Furutani et al., 2005). El gen OLFML2B está localizado en el cromosoma 1q23.3, que ha demostrado ser un locus de predisposición a la esquizofrenia en estudios de ligamiento (Puri et al., 2007).

Portadora de dominio repetido de tetratricopéptido 13 (TTC13)

TTC13 pertenece a la familia de las proteínas portadoras de un dominio de repetición de tetratricopéptido (TPR). Los dominios TPR parecen ser importantes para la función de chaperona, el ciclo celular, la transcripción y el transporte de proteínas, y las proteínas que contienen motivos TPR a menudo están vinculadas con complejos multiproteínicos (Blatch and Lassle, 1999). El gen TCC13 ha sido localizado en el cromosoma 1q42.2. El segmento cromosómico 1q42.2-43 ha sido descrito como un locus de un posible gen de predisposición al cáncer de próstata en un estudio de análisis por ligamiento (Berthon et al., 1998), aunque este extremo no ha sido confirmado en poblaciones más numerosas de pacientes en estudios posteriores (Singh, 2000; Gibbs et al., 1999).

Especialista de la citocinesis 2 (DOCK2)

La proteína codificada por el gen DOCK2 pertenece a la familia de la proteína CDM. El DOCK2 es conocido por ser un factor importante en la migración y la quimiotaxia de los linfocitos. Los estudios de secuenciación del genoma entero y del exoma han descubierto mutaciones del gen DOCK2 en el marco del cáncer colorrectal, el

adenocarcinoma de esófago y en neoplasias mucinosas papilares intraductales del páncreas (Yu et al., 2014; Dulak et al., 2013; Furukawa et al., 2011). Asimismo se ha constatado la expresión diferencial de DOCK2 en muestras de astrocitoma pediátrico, por lo que podría suponer una diana terapéutica interesante en esta enfermedad (Zhao et al., 2014a).

Relacionado con el receptor del poliovirus 1 (mediador C de la entrada del herpesvirus) (PVRL1)

El PVRL1 codifica una proteína de adhesión que interviene en la organización de las uniones adherentes y las zonas de oclusión en las células epiteliales y endoteliales. El gen PVRL1 está localizado en el cromosoma 11q23, una región que se ha hallado amplificada en el carcinoma quístico adenoide (Zhang et al., 2013). Con un cometido importante en la adhesión celular, el PVRL1 ha sido vinculado con la regulación de las propiedades invasivas y migratorias de las células así como con la transición del epitelio al mesénquima, procesos cruciales ambos en el desarrollo tumoral. El PVRL1 ha sido identificado como parte de un perfil característico del cáncer de cuello uterino del subtipo carcinoma epidermoide (Imadome et al., 2010). La expresión de PVRL1 se ha hallado elevada en tumores tiroideos con respecto al tejido tiroideo normal y aún más elevada en el cáncer papilar de tiroides (Jensen et al., 2010). La expresión de PVRL1/2 está vinculada con un pronóstico más favorable en la leucemia mieloide aguda (Graf et al., 2005).

Proteína 10 de unión a FK506, de 65 kDa (FKBP10)

El gen de la proteína 10 de unión a FK506 (FKBP10) pertenece a la familia de la peptidil-prolil cis/trans-isomerasa de tipo FKBP. Está localizada en el retículo endoplasmático y actúa como una chaperona molecular (Ishikawa et al., 2008; Patterson et al., 2000). Aparece notablemente expresada en el desarrollo del pulmón y puede ser reactivada de manera coordinada con proteínas de la matriz extracelular a raíz de daños pulmonares (Patterson et al., 2005).

Miembro 1 de la subfamilia C (CFTR/MRP) con casete de unión a ATP (ABCC1)

La proteína codificada por el gen ABCC1 pertenece a la superfamilia de los transportadores con casete de unión a ATP (ABC). Las proteínas ABC transportan varias moléculas a través de las membranas intra y extracelulares. La ABCC1

desempeña un papel importante como bomba expulsora de fármacos, tanto en células normales como tumorales (Chen and Tiwari, 2011). Varios estudios han descrito la sobreexpresión de la ABCC1 en diferentes tipos de tumores, y en muchos casos, una relación de sus niveles de expresión con el estadio tumoral, la metástasis y el pronóstico negativo (en el cáncer de mama, próstata o pulmón, entre otros) (Deeley et al., 2006). Un estudio en pacientes chinos descubrió un polimorfismo mononucleotídico (SNP) en dicho gen que agudiza la predisposición al cáncer de pulmón amicrocítico (Yin et al., 2011). Otro estudio ha descrito una relación entre varios polimorfismos SNP del ABCC1 con la supervivencia sin progresión de los pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico (Lamba et al., 2014).

Araquidonato 15-lipooxigenasa, de tipo B (ALOX15B)

El ALOX15B codifica un miembro de la familia de lipooxigenasas integrada por dioxigenasas con hierro no ligado al grupo hemo relacionadas estructuralmente que interviene en la producción de hidroperóxidos de ácidos grasos. El papel que la ALOX15B, más conocida como 15-LOX-2, y su producto enzimático, el ácido 15-S-hidroxieicosatetraenoico (15S-HETE), desempeñan en el desarrollo tumoral, ha sido objeto de numerosos estudios en el cáncer de próstata. Diversos de ellos han demostrado que los niveles de expresión de ALOX15B, así como los niveles de producción de 15S-HETE, se hallan sustancialmente reducidos en el cáncer de próstata con respecto al tejido o las estirpes celulares normales (Hu et al., 2013; Shappell et al., 2001). En el pulmón normal, la expresión de ALOX15B se halla restringida a los neumocitos de tipo II. La expresión es elevada en el cáncer de pulmón amicrocítico, y se ha descrito una correlación inversa entre los niveles de ALOX15B y el grado tumoral, así como con el índice de proliferación de las células tumorales (Gonzalez et al., 2004).

Esfingomielina fosfodiesterasa, similar a ácido 3B (SMPDL3B)

La SMPDL3B es una esfingomielina fosfodiesterasa que se expresa en los podocitos, cuya expresión ha sido vinculada con la nefropatía diabética y la glomeruloesclerosis segmentaria focal. La expresión a la baja de la SMPDL3B en la nefropatía ha sido relacionada con la remodelación del citoesqueleto de actina y la apoptosis (Merscher and Fornoni, 2014). El gen SMPDL3B ha sido localizado en el cromosoma 1p35.3.

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

La GFPT2 interviene en el crecimiento de las neuritas, en las primeras etapas del desarrollo de las neuronas, en la señalización/síntesis de neuropéptidos y como receptor neuronal (Tondreau et al., 2008). Algunas variantes genéticas de GFPT2 están relacionadas con la diabetes de tipo 2 y la nefropatía diabética (Zhang et al., 2004). Además, la relación de los SNP del GFPT2 parece apuntar a su implicación en la modulación de la vía oxidativa como un posible contribuyente de peso a la insuficiencia renal crónica derivada de la diabetes (Prasad et al., 2010). La metilación del ADN del gen GFPT2 ha sido confirmada en muestras de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Los pacientes que presentan metilación en múltiples islas de CpG presentan una peor supervivencia global (Kuang et al., 2008). La GFPT2 interviene en el metabolismo de la glutamina y se ha observado mayor expresión en estirpes de células mesenquimáticas. El metabolismo de la glutamina podría desempeñar un papel importante en la progresión tumoral y los inhibidores de las vías metabólicas celulares podrían servir como un tipo de terapia epigenética (Simpson et al., 2012).

Helicasa 5 con caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) (DDX5)

La DDX5 (p68) es una helicasa de ARN dependiente de ATP que intervienen en el corte y empalme, en el procesamiento del ARNr y en la biogénesis de los ribosomas, en el procesamiento del ARNmi, así como en la regulación de la transcripción. El DDX5 es un coactivador transcripcional de varios factores que intervienen en el desarrollo del cáncer, como el receptor de andrógenos, p53 y Runx2. La sobreexpresión de DDX5 ha sido demostrada en algunos tipos de tumores distintos, como por ejemplo el cáncer colorrectal, mama o próstata, el glioma, el carcinoma hepatocelular y la leucemia (Dai et al., 2014; Fuller-Pace, 2013).

Enolasa 1, (alfa) (ENO1)

El gen ENO1 codifica la enolasa-alfa (ENOA), una de las tres proteínas enolasas, a saber, la enolasa-beta y la gamma. La sobreexpresión de ENO1/ENOA ha sido demostrada en numerosos tipos de cáncer (Capello et al., 2011). La ENOA es una metaloenzima que actúa en la glucólisis sintetizando el fosfoenolpiruvato. Los niveles elevados de ENOA se han correlacionado con una supervivencia breve en los pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico (Chang et al., 2006). De forma parecida, otro estudio demostró la regulación al alza de la expresión de ENO1 en un grupo de

pacientes con adenocarcinoma de pulmón con pronóstico negativo (Pernemalm et al., 2013). Se ha demostrado que la ENOA es un antígeno tumoral y en pacientes con adenocarcinoma pancreático se han detectado tanto anticuerpos anti-ENOA como linfocitos T específicos contra ella (Cappello et al., 2009). En pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico también se han detectado autoanticuerpos contra la ENOA, y la expresión de esta enzima se ha hallado elevada en tejido de ese tipo de cáncer pulmonar (He et al., 2007; Li et al., 2006).

Receptor similar a lectina de célula K, subfamilia D, miembro 1 (KLRD1)

El KLRD1, más conocido como CD94, se combina con moléculas NKG2 para formar un heterodímero que se expresa en los linfocitos citolíticos naturales (o células NK) y en los linfocitos T citotóxicos (CTL). Se ha demostrado que el receptor inhibidor KLRD1 (CD94):NKG2A aparece sobreexpresado en los linfocitos infiltrados en el tumor, por ejemplo en el carcinoma de células renales y en el cáncer de cuello uterino, por lo que podría mermar la respuesta inmunitaria antitumoral (Schleypen et al., 2003; Sheu et al., 2005).De forma similar, la sobreexpresión de HLA-E, el ligando de KLRD1 (CD94):NKG2A, en las células tumorales podría contribuir adicionalmente a la llamada evasión inmunitaria del tumor (Bossard et al., 2012; Gooden et al., 2011).

Colágeno, tipo XII, alfa 1 (COL12A1)

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

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

En el ser humano, la familia de transportadores de membrana con casete de unión a ATP (ABC) cuenta como mínimo con 48 genes y 7 subfamilias de genes. La proteína predicha ABACA13 consiste en 5058 residuos de aminoácidos que la convierten en la mayor proteína ABC descrita hasta la fecha (Prades et al., 2002). Knight y cols. determinaron que la proteína ABCA13 se expresa en el hipocampo y en la corteza cerebral del ratón y el ser humano; ambas son regiones relevantes en la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Knight et al., 2009). El gen ABCA13 ha sido localizado en el cromosoma 7p12.3, una región donde radica un trastorno hereditario que afecta al páncreas (síndrome de Shwachman-Diamond) así como un locus implicado en la invasión y la metástasis de los tumores de linfocitos T (INM7), lo que lo convierte en un candidato posicional de esas patologías (Prades et al., 2002).

Ciclina B2 (CCNB2)

La CCNB2 es una de las diversas ciclinas vinculadas con una de las principales cinasas reguladoras del ciclo celular, la CDK1 (CDC2). Los niveles de ciclina son regulados transcripcionalmente a lo largo del ciclo celular, proporcionando diferentes niveles de actividad y de especificidad a la CDK1, que controla la progresión del ciclo celular. La expresión de la ciclina B2 está regulada por los genes oncosupresores p53 y BRCA1, que actúan reprimiendo la transcripción de dicha ciclina (Quaas et al., 2012; De et al., 2011). La regulación al alza de CCNB2 ha sido descrita en varios tipos de tumores, como el cáncer de cuello uterino (Espinosa et al., 2013; Rajkumar et al., 2011), el cáncer de vejiga (Lu et al., 2010), el carcinoma colorrectal (Park et al., 2007), el astrocitoma (Liu et al., 2013) y el glioblastoma (Hodgson et al., 2009). Los niveles de expresión de CCNB2 han aparecido relacionados con un pronóstico negativo en el cáncer de mama y han sido identificados como un marcador pronóstico independiente de la supervivencia (Shubbar et al., 2013). El CCNB2 se sobreexpresa en el cáncer de pulmón amicrocítico (Hofmann et al., 2004), y fue identificado como un predictor independiente de un pronóstico negativo en pacientes con adenocarcinoma de pulmón, pero no en el carcinoma epidermoide (Takashima et al., 2014).

Homólogo 6 de MutS (MSH6)

El MSH6 codifica un miembro de la familia MutS, que repara errores de emparejamiento en el ADN. Las proteínas MSH, entre ellas la MSH6, reconocen

errores en la secuencia genómica durante la replicación, impiden la duplicación de la cadena dañada y reparan las roturas monocatenarias (Conde-Perezprina et al., 2012). En diversos tipos de cáncer se han descrito mutaciones en la MSH6 y alteraciones en la maquinaria reparadora de los desemparejamientos del ADN (MMR) (p. ej. cáncer colorrectal (Sameer et al., 2014; Vilar and Gruber, 2010; Silva et al., 2009; Kastrinos and Syngal, 2007; Davidson, 2007), de páncreas (Solomon et al., 2012), ovario (Xiao et al., 2014) o mama (Mahdi et al., 2013)).

Homólogo del factor 3 de procesamiento de pre-ARNm PRP3 (*S. cerevisiae*) (PRPF3)
El PRPF3 codifica el factor 3 de procesamiento del pre-ARNm. El PRPF3 interviene en la captación de la maquinaria de degradación del ARN nuclear hacia el spliceosoma(Nag and Steitz, 2012). El PRPF3 aparece regulado al alza en el carcinoma hepatocelular a través de una variante de corte y empalme del factor de transcripción HNF4alfa que es específica del feto y del cáncer (Niehof and Borlak, 2008).

Lisofosfatidilcolina aciltransferasa 1 (LPCAT1)
La LPCAT1 cataliza la conversión de la lisofosfatidil-colina (LPC) en fosfatidilcolina. Asimismo, la LPCAT1 es capaz de convertir la liso-PAF (LPC alquilada) en el factor activador de plaquetas (PAF). La sobreexpresión de LPCAT1 ha sido descrita en el cáncer colorrectal (Mansilla et al., 2009), el carcinoma hepatocelular (Morita et al., 2013), el cáncer de mama (Abdelzaher and Mostafa, 2015), el cáncer de próstata (Xu et al., 2013; Grupp et al., 2013; Zhou et al., 2012) y el cáncer de pulmón (Wu et al., 2013b). La sobreexpresión de LPCAT1 promovió la proliferación celular, la migración y la invasión *in vitro* (Morita et al., 2013).

Vecino consecutivo (*downstream*) de SON (DONSON)
DONSON es el gen situado corriente abajo de SON (DONSON). La DONSON es una proteína centrosómica cuyo nivel está regulado durante todo el ciclo celular, con el máximo en la fase S. DONSON es necesaria para la formación del huso mitótico normal, y parece intervenir en la respuesta a los daños del ADN (Fuchs et al., 2010). No existe bibliografía relacionada con el cáncer.

Homólogo beta de gemación desinhibida por benzimidazoles 1 (levadura) (BUB1B)

El BUB1B codifica la serina/treonina-cinasa B del punto de control de la mitosis BUB1, una proteína cinasa de serina y treonina. Actúa como regulador mitótico que asegura la segregación precisa de los cromosomas a través de su papel en el punto de control de la mitosis y el establecimiento de los anclajes adecuados entre el cinetocoro y los microtúbulos. En diversos tumores se ha descrito tanto la regulación al alza como a la baja de la expresión de BUB1B. En general, existe más bibliografía que señala la sobreexpresión de BUB1B en el cáncer, y se ha descrito una relación con la progresión tumoral y el pronóstico malo, como por ejemplo en el carcinoma rinofaríngeo (Huang et al., 2012a), el carcinoma amigdalino (Hannisdal et al., 2010), el cáncer de mama(Maciejczyk et al., 2013), el cáncer de ovario epitelial (Lee et al., 2009), y el adenocarcinoma de tipo pancreatobiliar (Gladhaug et al., 2010). De manera similar, la disminución de la proteína BUB1B se ha relacionado con una supervivencia más larga en el cáncer de próstata (Cirak et al., 2013).

Componente 4 del complejo oligomérico del Golgi (COG4)

El COG4 forma parte de un complejo proteico oligomérico implicado en la estructura y la función del aparato de Golgi. Los estudios de interacción indican que COG4 actúa como un componente central del complejo y desempeña un cometido esencial en el montaje y la función del mismo (Loh and Hong, 2004). Las subunidades COG4, 6, y 8 son capaces de interaccionar con ciertas SNARE del aparato de Golgi e intervienen en el proceso de selección de las vesículas en el seno de dicho orgánulo definiendo la especificidad del proceso (Willett et al., 2013). Asimismo, el complejo COG regula el mantenimiento de la maquinaria de glucosilación del aparato de Golgi (Pokrovskaya et al., 2011).

Subunidad 26S (Prosoma, macropaína) del proteosoma, no ATPasa, 14 (PSMD14)

La PSMD14 es un componente del proteosoma 26S, un complejo multiproteínico que degrada proteínas destinadas a ser destruidas a través de la vía de la ubiquitina. Pertenece al complejo 19S (caperuza 19S; PA700), que es responsable de la desubiquitinización del sustrato durante la degradación proteosómica (Spataro et al., 1997). La expresión aberrante y la disfunción de las subunidades del proteosoma han sido implicadas en la transformación maligna y en la resistencia celular a diversos fármacos citotóxicos. La sobreexpresión de la PSMD14 en células de mamífero afecta a la proliferación celular y a la respuesta a fármacos citotóxicos como la vimblastina,

el cisplatino y la doxorrubicina (Spataro et al., 2002). La regulación a la baja de PSMD14 por ARNsi ejerció un impacto considerable en la viabilidad celular causando la parada del ciclo celular en la fase G0-G1, lo que en última instancia acabó precipitando la senescencia (Byrne et al., 2010).

Homólogo B de RAD54 (*S. cerevisiae*) (RAD54B)

La proteína de recombinación y reparación del ADN RAD54B es una proteína que en el ser humano está codificada por el gen RAD54B. La RAD54 se une al ADN bicatenario y muestra actividad ATPasa ante la presencia de ADN. La proteína humana RAD54B es un parálogo de la proteína RAD54, que desempeña funciones importantes en la recombinación homóloga. La recombinación homóloga es esencial para la reparación precisa de las roturas bicatenarias del ADN (Sarai et al., 2008). La reducción deliberada de la expresión de RAD54B, un gen que se ha visto mutado somáticamente en el cáncer, causa inestabilidad cromosómica en células de mamífero (McManus et al., 2009). La expresión génica elevada del RAD54B está asociada significativamente con un tiempo hasta la progresión más corto y una supervivencia global peor en los pacientes con glioblastoma (Grunda et al., 2010).

Receptor 1 de la familia *Frizzled* (FZD1), Receptor 2 de la familia *Frizzled* (FZD2), Receptor 7 de la familia *Frizzled* (FZD7)

Los genes FZD2, FZD1 y FZD7 pertenecen a la familia de genes '*frizzled*', cuyos miembros codifican proteínas dotadas de 7 dominios transmembrana que actúan como receptores para las proteínas de transducción de señales Wnt. La expresión del gen FZD2 aparece regulada a lo largo del desarrollo, con niveles altos de expresión en el pulmón y el riñón fetales así como en el colon y el ovario adultos (Sagara et al., 1998; Zhao et al., 1995). La proteína FZD1 contiene un péptido señal, un dominio rico en cisteínas de la región extracelular del extremo N-terminal, 7 dominios transmembrana, y un motivo de unión o dominio PDZ en el extremo C-terminal. El transcrito de FZD1 se expresa en diversos tejidos, como el pulmón y el corazón, el riñón, páncreas, próstata y ovario (Sagara et al., 1998). La expresión de los receptores de *frizzled* 1 y 2 se ha hallado regulada al alza en el cáncer de mama (Milovanovic et al., 2004). La proteína FZD7 contiene una secuencia señal N-terminal, 10 residuos de cisteína típicos del dominio extracelular rico en cisteínas propio de los miembros de la familia Fz, 7 presuntos dominios transmembrana, y una cola C-terminal intracelular

con un motivo de unión-dominio PDZ. La expresión del gen FZD7 podría regular a la baja la función de APC y potenciar las señales mediadas por la beta-catenina en los carcinomas de esófago poco diferenciados (Sagara et al., 1998; Tanaka et al., 1998).

Familia del sitio de integración MMTV de tipo sin alas, miembro 5A (WNT5A)

En general, el Wnt5a regula diversas funciones celulares, como la proliferación, la diferenciación, migración, adhesión y polaridad (Kikuchi et al., 2012). Se expresa en citoblastos embrionarios humanos indiferenciados (Katoh, 2008). A la WNT5A se la clasifica como un miembro no transformante de la familia WNT cuya función en la carcinogenia sigue siendo ambiguo. Muestra actividades oncosupresoras en algunos tipos de cáncer (tiroides, mama y recto y colon), pero aparece regulada al alza de modo aberrante en los de pulmón, estómago y próstata (Li et al., 2010a). El WNT5A oncógeno activa la vía de señalización canónica del WNT en los citoblastos tumorales que potencia la autorrenovación, y la vía de señalización no canónica del WNT en la interfaz tumor-estroma que potencia la invasión y la metástasis (Katoh and Katoh, 2007). La expresión de la WNT5A ha sido descrita en ciertos tipos de tumores. Por ejemplo, la expresión anómala de la proteína Wnt5a se ha observado en el 28% de los cánceres de próstata, donde fomenta la malignidad (Yamamoto et al., 2010). Asimismo, se ha descrito que la sobreexpresión de WNT5A estaría asociada con un pronóstico malo y/o con el incremento del grado tumoral en el cáncer de ovario (Badiglian et al., 2009), melanoma (Da Forno et al., 2008; Weeraratna et al., 2002), GBM (Yu et al., 2007), cáncer de pulmón (Huang et al., 2005) y cáncer de páncreas (Ripka et al., 2007). En el carcinoma hepatocelular, parece que la vía de señalización canónica del WNT contribuye a la iniciación del tumor y, por su parte, la señalización no canónica a la progresión tumoral (Yuzugullu et al., 2009).

Proteína activadora de fibroblastos, alfa (FAP)

La proteína activadora de fibroblastos (FAP) es una glucoproteína integral de membrana de tipo II que pertenece a la familia de las proteasas de serina. La presunta actividad proteasa de serinas de la FAP alfa y su patrón de inducción *in vivo* podrían delatar el papel de esta molécula en el control del crecimiento de los fibroblastos o de las interacciones entre el epitelio y el mesénquima durante el desarrollo, la reparación de tejidos y la carcinogenia epitelial (Scanlan et al., 1994). La mayoría de los tejidos adultos normales y los tumores epiteliales benignos presentan una expresión mínima

o indetectable de FAP. Sin embargo, su expresión sí se detecta en el estroma de más del 90% de los tumores malignos de mama, colorrectales, pulmón, piel y páncreas, en los fibroblastos de las heridas en proceso de cicatrización, en los sarcomas de partes blandas y en algunas células mesenquimáticas fetales. La FAP tiene un papel potencial en el crecimiento tumoral y la metástasis a través de procesos de adhesión y migración celular, así como de la degradación rápida de los componentes de la matriz extracelular. Así pues, está presente en células tumorales que invaden la matriz extracelular y en células endoteliales que intervienen en la angiogenia, pero no se expresa en células inactivas del mismo tipo (Dolznig et al., 2005; Kennedy et al., 2009; Rettig et al., 1993; Rettig et al., 1994; Scanlan et al., 1994; Zhang et al., 2010a).

Ciclina B1 (CCNB1)

El CCNB1 codifica la ciclina B1, una de las diversas ciclinas mitóticas que se asocian con la CDK1/CDC2 para promover la progresión de la mitosis. La sobreexpresión de CNB1 ha sido descrita en numerosos tipos de cáncer y se ha relacionado con la progresión tumoral y el pronóstico malo, como por ejemplo en el carcinoma colorrectal (Li et al., 2003), el cáncer de mama (Aaltonen et al., 2009; Agarwal et al., 2009), el cáncer de pulmón amicrocítico (Cooper et al., 2009) y el carcinoma epidermoide de esófago (Huang et al., 2014). También en el cáncer gástrico, la expresión de CCNB1 se ha vinculado con la metástasis ganglionar linfática y un pronóstico clínico negativo (Begnami et al., 2010; Fujita et al., 2012). En pacientes con cáncer de pulmón o próstata se han detectado anticuerpos dirigidos contra el CCNB1, por lo que han sido propuestos como biomarcador para la detección precoz del cáncer de pulmón (Egloff et al., 2005; Zhang et al., 2003).

ATPasa, transportadora de Ca++, músculo cardíaco, contracción rápida 1 (ATP2A1), ATPasa, transportadora de Ca++, músculo cardíaco, contracción rápida 2 (ATP2A2)

Ambos genes (ATP2A1 y ATP2A2) codifican las Ca(2+)-ATPasas SERCA. Las ATPasas de calcio del retículo endoplasmático/sarcoplasmático (SR)1/ER o SERCA, son bombas de calcio que acoplan la hidrólisis del ATP al transporte de calcio a través de la membrana del RE/RS (MacLennan et al., 1997). Las SERCA son codificadas por tres genes homólogos: SERCA1 (ATP2A1), SERCA2 (ATP2A2) y SERCA3 (Wu et al., 1995). Algunos indicios apuntan a que las SERCA también podrían influir directamente en los procesos de apoptosis, diferenciación y proliferación celular (Chami et al., 2000;

Ma et al., 1999; Sakuntabhai et al., 1999). Las mutaciones de ATP2A1, que codifica la SERCA1, causan ciertas formas autosómicas recesivas de la enfermedad de Brody, caracterizada por la alteración creciente de la relajación muscular durante el ejercicio (Odermatt et al., 1996). La ATP2A2 es una ATPasa relacionada con la enfermedad de Darier, un raro trastorno cutáneo, hereditario y autosómico dominante que se caracteriza por queratinización anómala y acantólisis (Huo et al., 2010). Las alteraciones germinales de la ATP2A2 podrían predisponer al cáncer de pulmón y de colon y un gen ATP2A2 alterado podría estar implicado en la carcinogenia (Korosec et al., 2006). En una estirpe de células de cáncer de pulmón microcítico (H1339) y en otra de adenocarcinoma de pulmón (HCC) el contenido de Ca2+ del retículo endoplasmático apareció reducido con respecto al epitelio bronquial humano normal. Ese menor contenido de Ca2+ se ha relacionado con una expresión menor de la SERCA 2 que bombea el calcio al interior del retículo endoplasmático (Bergner et al., 2009). Las ATP2A2 podrían servir como marcadores pronósticos del cáncer colorrectal en pacientes aquejados por el mismo. Se ha detectado en células tumores circulantes, y la recidiva posquirúrgica se ha correlacionado significativamente con la sobreexpresión del gen (Huang et al., 2012b).

Fibronectina 1 (FN1)

El FN1 codifica la fibronectina, una glucoproteína presente en forma de dímeros solubles en el plasma y que aparece de ese mismo modo o formando multímeros en la superficie celular y en la matriz extracelular. Descrita en muchos tumores, la FN1 se expresa predominantemente en los fibroblastos (CAF) y en las células endoteliales asociados con el cáncer, pero no en las células tumorales (Berndt et al., 2010). Se han descrito niveles elevados de FN1 en ciertos tipos de cáncer que han sido vinculados con un pronóstico malo o con la progresión tumoral, como por ejemplo en el de vesícula biliar (Cao et al., 2015), el de próstata (von et al., 2013), o en el carcinoma de células renales (Steffens et al., 2012; Waalkes et al., 2010). La FN1 también ha sido implicada en la estimulación de la patogenia del cáncer de pulmón, incluido el crecimiento celular, la quimiorresistencia y la inhibición de la apoptosis (revisión en (Ritzenthaler et al., 2008)).

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

La IGF2BP3 pertenece a la familia de las proteínas de unión al ARNm del factor de crecimiento insulinoide-II, implicada en la localización, el recambio y el control traduccional del ARNm. La proteína contiene varios dominios KH (homólogos de K), que son importantes para la unión al ARN y se sabe que intervienen en la síntesis y el metabolismo del ARN. La expresión ocurre principalmente en el desarrollo embrionario y ha sido descrita en algunos tumores. Por ello, a la IGF2BP3 se la considera una proteína oncofetal (Liao et al., 2005). La IGF2BP3 puede promover la proliferación de células tumorales al potenciar la síntesis de la proteína IGF-II e inducir la adhesión celular y la invasión a través de la estabilización del ARNm de CD44 (Findeis-Hosey and Xu, 2012). Asimismo, la expresión de IGF2BP3 ha sido objeto de estudio en muchas neoplasias humanas con indicios crecientes de que interviene en la migración, invasión, supervivencia celular y metástasis tumoral (Jeng et al., 2009; Kabbarah et al., 2010; Li et al., 2011; Liao et al., 2011; Lu et al., 2011; Hwang et al., 2012; Samanta et al., 2012) y también podría estar implicada en la angiogenia. En los adenocarcinomas de pulmón se puede detectar una alta frecuencia de expresión de la IGF2BP3 en adenocarcinomas poco o moderadamente diferenciados, lo que podría relacionarla con un comportamiento biológico agresivo (Findeis-Hosey et al., 2010; Beljan et al., 2012; Findeis-Hosey and Xu, 2012).

Laminina, gamma 2 (LAMC2)

Las lamininas, una familia de glucoproteínas de la matriz extracelular, constituyen el principal componente de las membranas basales después del colágeno. Han sido implicadas en una amplia variedad de procesos biológicos como la adhesión, diferenciación, migración y señalización celulares, el crecimiento de las neuritas y la metástasis. El gen LAMC2 codifica la cadena gamma 2 de la laminina 5, parte de dicha laminina, uno de los principales componentes de la zona de la membrana basal. La LAMC2 se ha hallado a menudo regulada al alza por la desmetilación de su promotor en el cáncer gástrico (Kwon et al., 2011). Se la ha hallado sobreexpresada en zonas angiotrópicas del melanoma con respecto a zonas avasculares del mismo (Lugassy et al., 2009). La LAMC2 es un biomarcador de las metástasis del cáncer de vejiga urinaria, y su nivel de expresión se ha asociado con el grado tumoral (Smith et al., 2009b). Los genes LAMB3 y LAMC2 se han hallado co-expresados en 21 de 32 estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico (66%), pero solo en una de 13 estirpes celulares del tipo microcítico (8%). La coexpresión de los genes LAMB3 y

LAMC2 también se ha observado en 4 casos de células de cáncer de pulmón no microcítico primario examinadas, pero no en las respectivas células pulmonares no cancerosas (Manda et al., 2000).

Molécula de adhesión celular del endotelio cerebral (CERCAM)

La CERCAM radica en la superficie de las células endoteliales (Starzyk et al., 2000) y se la ha localizado en el cromosoma 9q34.11, una región candidata del 9q, a la cual se la ha vinculado con la escoliosis idiopática familiar (Miller et al., 2012). El gen CEECAM1 se transcribe extensamente en el sistema nervioso y en diversos tejidos secretores como las glándulas salivales, el páncreas, el hígado y la placenta (Schegg et al., 2009). La proteína CERCAM guarda similitudes estructurales con las enzimas ColGalT GLT25D1 y GLT25D2. A pesar de que su función aún se ignora, parece ser distinta de la afín proteína GLT25D1, pues no actúa como glucosiltransferasa, como es el caso de las GLT25D1 y GLT25D2 (Perrin-Tricaud et al., 2011).

Asociada a la remodelación de la matriz 5 (MXRA5)

MXRA5, también llamado adlicano, codifica un proteoglucano de adhesión que pertenece a un grupo de genes implicados en la remodelación de la matriz extracelular y en la adhesión entre células (Rodningen et al., 2008). Aunque se desconoce la función del MXRA5 en el cáncer, se han descubierto mutaciones somáticas de este gen en tumores localizados en tejidos muy diversos, como piel, encéfalo, pulmón u ovario. El análisis por RT-PCR del adlicano (MXRA5) confirmó los hallazgos en micromatrices de su sobreexpresión en tumores de colon con respecto al tejido colónico normal (13 tumores colorrectales y 13 tejidos normales) (Zou et al., 2002). En un estudio reciente, la proteína asociada a la remodelación de la matriz 5 fue el segundo gen mutado con más frecuencia en el cáncer de pulmón amicrocítico (el primero es el TP53) (Xiong et al., 2012).

Portadora de dominio de metalopeptidasa ADAM 8 (ADAM8)

El ADAM8 pertenece a la familia de las ADAM (portadoras de dominio de metaloproteasa y desintegrina). Muchos tipos de ADAM, incluida la ADAM8, se expresan en tumores malignos humanos, donde intervienen en la regulación de las actividades de los factores de crecimiento y de las funciones de las integrinas, lo que desemboca en la promoción del crecimiento y la invasión celular (Mochizuki and

Okada, 2007). La expresión de ADAM8 se ha correlacionado positivamente con la del EGFR. Ambos se expresan principalmente en el citoplasma y en la membrana celular (Wu et al., 2008). La ADAM8 se expresa profusamente en la gran mayoría de los cánceres de pulmón examinados. La expresión exógena de ADAM8 aumentó la actividad migratoria de las células de mamífero, un indicio de su posible papel relevante en la progresión del cáncer de pulmón (Ishikawa et al., 2004). La ADAM8 ha sido asociada con un pronóstico negativo del cáncer de pulmón (Hernandez et al., 2010). La sobreexpresión de ADAM8 se ha relacionado con una supervivencia más breve del paciente y resultó ser un predictor fiable de las metástasis a distancia en el carcinoma de células renales (Roemer et al., 2004b; Roemer et al., 2004a). Asimismo, los niveles de expresión y las actividades proteásicas de la ADAM8 se han correlacionado con la actividad invasora de las células de glioma, lo cual apunta a su posible papel significativo en la invasión tumoral en el cáncer de cerebro (Wildeboer et al., 2006).

Familia F de antígenos del melanoma, 1 (MAGEF1)

La mayoría de los miembros de la superfamilia MAGE (antígenos asociados al melanoma) se expresan en tumores, en el testículo y en tejidos fetales, y han sido descritos como dotados del patrón de expresión cáncer/testículo (subgrupo I de MAGE). Los péptidos del subgrupo I de MAGE han sido empleados con éxito en vacunas peptídicas y de células dendríticas (Nestle et al., 1998; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1995; Thurner et al., 1999). En cambio, ciertos genes MAGE (subgrupo II), como MAGEF1, se expresan ubicuamente en todos los tejidos fetales y adultos analizados, así como en muchos tipos de tumores como los de ovario, mama, cuello uterino, melanoma y leucemia (Nestle et al., 1998; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1999; Marchand et al., 1995; Thurner et al., 1999). No obstante, la sobreexpresión de MAGEF1 podría detectarse en el cáncer de pulmón amicrocítico (Tsai et al., 2007) y en el 79% de una cohorte de pacientes taiwaneses con cáncer colorrectal (Chung et al., 2010).

Ribonucleoproteína nuclear pequeña de 200 kDa (U5) (SNRNP200)

El corte y empalme del pre-ARNm es catalizado por el spliceosoma, un complejo especializado de subunidades de ARN y proteicas que elimina los intrones de un segmento transcrito de pre-ARNm. El spliceosoma consta de las ribonucleoproteínas

nucleares pequeñas (snRNP) U1, U2, U4, U5 y U6 y en torno a otras 80 proteínas conservadas. El SNRNP200 es un gen necesario para la rotura del complejo U4/U6, un paso esencial en la activación catalítica del spliceosoma (Maeder et al., 2009). La expresión del SNRNP200 se ha detectado en el corazón, encéfalo, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas (Zhao et al., 2009a). En fecha reciente se han descubierto mutaciones en el SNRNP200 que han sido relacionadas con la retinitis pigmentosa autosómica dominante (adRP) (Benaglio et al., 2011; Liu et al., 2012).

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

El TPX2 es un factor que interviene en el montaje del huso. Es necesario para el montaje de los husos mitóticos y de los microtúbulos durante la apoptosis. El TPX2 también es necesario para la nucleación de los microtúbulos dependiente del cinetocoro y/o de la cromatina (Bird and Hyman, 2008; Moss et al., 2009). Se precisa TPX2 sintetizado *de novo* para la activación de casi todos los Aurora A y para la síntesis completa del p53 y la fosforilación *in vivo* durante la maduración del ovocito (Pascreau et al., 2009). La TPX2 es una proteína vinculada al ciclo celular que aparece sobreexpresada en muchos tipos de tumores, como los meningiomas (Stuart et al., 2010), el carcinoma epidermoide de laringe (SCCL) (Cordes et al., 2010), los carcinomas epidermoides orales (SCC) (Shigeishi et al., 2009), carcinomas hepatocelulares (CHC) (Satow et al., 2010), tumor pancreático (Warner et al., 2009), cáncer de ovario (Ramakrishna et al., 2010), carcinoma epidermoide de pulmón (Lin et al., 2006; Ma et al., 2006). Con frecuencia se sobreexpresa conjuntamente con Aurora-A dando lugar a una nueva unidad funcional con propiedades oncógenas (Asteriti et al., 2010). La expresión de TPX2 es un indicador pronóstico del cáncer de pulmón (Kadara et al., 2009).

Gen inducido por el factor de crecimiento transformante beta, de 68 kDa (TGFBI)

El TGFBI fue identificado por primera vez como un gen inducible por el TGF-beta en una estirpe celular de adenocarcinoma de pulmón humano. Codifica una proteína segregada en la matriz extracelular, que supuestamente participa en la fijación celular y en la composición de dicha matriz. En circunstancias normales, la expresión del TGFBI se circunscribe principalmente a los fibroblastos, los queratinocitos y las células musculares (Bae et al., 2002). El TGFBI se sobreexpresa en varios tumores sólidos

como el de colon (Kitahara et al., 2001), páncreas (Schneider et al., 2002) o riñón (Ivanov et al., 2008). El TGFBI aparece regulado a la baja en el cáncer de pulmón (Zhao et al., 2004; Shao et al., 2006), reduce el potencial metastásico de las células pulmonares tumorales (Wen et al., 2011) y cuando se sobreeexpresa, contribuye a la muerte celular por apoptosis (Zhao et al., 2006). En muestras de cáncer de pulmón amicrocítico se ha observado una estrecha relación entre la expresión elevada del TGFBI y la respuesta a la quimioterapia (Irigoyen et al., 2010).

Cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), cinasa 6 dependiente de ciclina (CDK6)

La CDK4 pertenece a la familia de las proteínas-cinasas de serina y treonina. Es una subunidad catalítica del complejo de la proteína cinasa que es importante para la progresión de la fase G1 del ciclo celular. La actividad de esta cinasa se limita a la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular y su expresión está controlada principalmente a nivel transcripcional (Xiao et al., 2007). Las enzimas CDK4 y CDK6 y sus reguladores, p. ej. las ciclinas, desempeñan funciones esenciales en la embriogenia, la homeostasis y la oncogenia (Graf et al., 2010). En tejidos de cáncer de pulmón, el nivel de expresión de la proteína CDK4 apareció notablemente elevado con respecto a tejidos normales ($P < 0,001$).Los pacientes con una expresión elevada de CDK4 gozaron de un tiempo de supervivencia global notablemente más breve que los pacientes con una baja expresión de la misma. El análisis multivariable indicó que el nivel de expresión de la CDK4 era un indicador pronóstico independiente ($P < 0,001$) de la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón. Asimismo, la supresión de la expresión de CDK4 también elevó sustancialmente la expresión del regulador del ciclo celular p21 (Wu et al., 2011). En células pulmonares que expresan el oncogén endógeno K-Ras, la abolición de la Cdk4, pero no la de la Cdk2 o la Cdk6, indujo una respuesta de senescencia inmediata. Tal respuesta no sucede en los pulmones que expresan un solo alelo de Cdk4 ni en otros tejidos que expresan K-Ras. La abolición de los alelos de Cdk4 en los tumores avanzados detectables por tomografía computerizada también induce la senescencia y evita la progresión del tumor (Puyol et al., 2010).

Versicano (VCAN)

El gen VCAN pertenece a la familia de los proteoglucanos agrecano/versicano. Es sabido que el VCAN se asocia con otras moléculas de la matriz extracelular, entre

ellas el hialuronano, la tenascina, fibulina-1, fibronectina, CD44 y L-selectina, fibrilina, integrina y la proteína de enlace (*link protein*) (Zheng et al., 2004). El VCAN se expresa en diversos tejidos. Se expresa con profusión en las primeras fases del desarrollo tisular, que expresión disminuye con la maduración del tejido. La expresión también se eleva durante la cicatrización de las heridas y en el crecimiento tumoral (Ghosh et al., 2010). La reducción de la expresión del VCAN en células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) por medio de ARN de interferencia inhibió sustancialmente el crecimiento tumoral *in vivo* pero no *in vitro* (Creighton et al., 2005). El VCAN es una diana directa de p53.Se ha detectado la expresión elevada del VCAN en el estroma peritumoral de tumores de próstata en estadio inicial y en el de tumores de mama, que ha sido relacionada con una mayor malignidad del tumor (Yoon et al., 2002).

Enzima conjugadora de ubiquitina E2S (UBE2S)

La UBES2 es un factor auxiliar del complejo promotor de la anafase (APC) que promueve la finalización de la mitosis. Su eliminación prolonga la detención de la mitosis provocada por fármacos y suprime la elusión de dicha detención (Garnett et al., 2009). La UBE2S aparece sobreexpresada en tumores humanos frecuentes. En el cáncer de esófago aparece vinculada significativamente con la magnitud de la carga tumoral. Su positividad está vinculada con una respuesta negativa al tratamiento neoadyuvante y con una supervivencia peor (Chen et al., 2009). En el promotor de UBE2S se han descubierto sitios de unión para la Egr-1 (respuesta de crecimiento precoz-1) y el SRF (factor de respuesta sérica). La sobreexpresión de dichos factores aumentó la expresión de UBE2S que fue necesaria para la proliferación de las células tumorales (Lim et al., 2008).

Portadora 3 del dominio MYND y SET (SMYD3)

Se ha descrito con anterioridad que la regulación al alza de la SMYD3, una metiltransferasa específica de la lisina 4 de la histona H3, desempeña un papel fundamental en la proliferación del carcinoma colorrectal (CCR) y en el carcinoma hepatocelular (CHC). En otro estudio se reveló que la expresión de la SMYD3 también es elevada en la gran mayoría de tejidos tumorales mamarios. A semejanza de lo que sucede en el carcinoma colorrectal y el carcinoma hepatocelular, el silenciamiento del gen SMYD3 por ARN de interferencia pequeños provocó la inhibición del crecimiento

de las células tumorales mamarias, lo cual apunta a que el aumento de su expresión también sería esencial para la proliferación de dichas células (Hamamoto et al., 2006). La reducción de la expresión del SMYD3 por medio de ARN de interferencia regula a la baja la expresión de c-Met e inhibe la migración y la invasión celular inducida por el HGF (Zou et al., 2009). SMYD3 cumple cometidos cruciales en la proliferación y en la migración/invasión de las células HeLa, y podría servir como diana terapéutica en el carcinoma de cuello uterino humano (Wang et al., 2008).

Distonina (DST)

El DST (BPAG1-e) codifica un miembro de la familia de la proteína plakina, integrada por proteínas de las placas de las uniones de adhesión. La BPAG1-e se expresa en el tejido epitelial, donde ancla los filamentos intermedios portadores de queratina a los hemidesmosomas (HD). Las HD son complejos multiproteicos de adhesión que promueven la unión del estroma al epitelio en los epitelios complejos y estratificados. La modulación de su función tiene una importancia crucial en diversos procesos biológicos, como la diferenciación y la migración de los queratinocitos durante la cicatrización de las heridas y la invasión del carcinoma, en que las células se separan del sustrato y adquieren un fenotipo móvil (Litjens et al., 2006). El melanoma maligno es uno de los tipos de tumor más agresivos. La BPAG1 se expresan en estirpes celulares de melanoma humano (A375 y G361) y en melanocitos humanos normales. Los niveles de autoanticuerpos anti-BPAG1 en el suero de pacientes con melanoma resultaron notablemente mayores que en el suero de voluntarios sanos ($p<0,01$). Tales autoanticuerpos anti-BPAG1 podrían servir como un marcador prometedor para el diagnóstico del melanoma (Shimbo et al., 2010). La DST ha sido relacionada con la invasión en el cáncer de mama (Schuetz et al., 2006). Es probable que el gen BPAG1 intervenga en la proliferación, apoptosis, invasión y metástasis del carcinoma rinofaríngeo (NPC) (Fang et al., 2005).

Familia de transportadores de solutos 34 (fosfato sódico), miembro 2 (SLC34A2)

El SLC34A2 es un transportador de fosfato dependiente de sodio que es sensible al pH. La regulación al alza de la expresión del gen SLC34A2 en tumores diferenciados podría reflejar procesos de diferenciación celular durante la oncogenia ovárica y podría servir como marcador para el diagnóstico y el diagnóstico del cáncer de ovario (Shyian et al., 2011). La RT-PCR confirmó la expresión elevada del SLC34A2 en el

cáncer papilar de tiroides (Kim et al., 2010b). También se ha detectado un aumento sustancial de su expresión en tejidos de cáncer de mama con respecto a tejidos normales (Chen et al., 2010).

Tenascina C (hexabraquión) (TNC)

La tenascina-C (TNC) es una proteína de la matriz extracelular que experimenta una regulación al alza muy acusada en procesos estrechamente vinculados con la actividad como son el desarrollo embrionario (Bartsch et al., 1992), la cicatrización de heridas (Mackie et al., 1988) y los procesos neoplásicos (Mackie et al., 1988). Además, la TNC aparece sobreexpresada en vasos tumorales que muestran un elevado índice proliferativo, lo cual indica su implicación en la angiogenia neoplásica (Kim et al., 2000). También se ha descrito la sobreexpresión de la TNC en el cáncer de colon (De et al., 2013), el carcinoma quístico adenoide, donde ha sido asociada con un pronóstico peor (Siu et al., 2012), en el angiofibroma rinofaríngeo juvenil, donde posiblemente promueva la angiogenia (Renkonen et al., 2012), en el melanoma avanzado, y en el cáncer de páncreas, donde interviene en la proliferación, la migración y la metástasis (Paron et al., 2011).

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

La reticulocalbina 1 es una proteína de unión a calcio localizada en la luz del retículo endoplasmático. El examen inmunohistoquímico ha demostrado la amplia distribución de las RCN en diversos órganos del feto y del adulto, mayoritariamente en órganos endocrinos y exocrinos. La sobreexpresión de RCN podría jugar un papel en la oncogenia, la invasión tumoral y la farmacorresistencia (Fukuda et al., 2007). La reticulocalbina 1 (RCN1) es una proteína que aparece vinculada a la superficie celular tanto en estirpes de células de cáncer de próstata (PCa) como del endotelio (EC). La expresión de la RCN1 en la superficie celular es regulada al alza por el tratamiento con el factor de necrosis tumoral alfa de las células endoteliales de la médula ósea (Cooper et al., 2008). La RCN1 aparece regulada al alza en el carcinoma colorrectal (CCR) y ha sido localizada en células cancerosas y en las células estromales cercanas a ellas. Podría ser un nuevo candidato a marcador del CCR (Watanabe et al., 2008). La RCN3 pertenece a la familia CREC (Cab45/reticulocalbina/ERC45/calumenina) de proteínas de unión a Ca^{2+} con múltiples manos EF localizada en la vía secretora

(Tsuji et al., 2006). Se ha sugerido que la RCN3 podría ser un gen candidato importante en los oligodendrogliomas, aunque se sabe muy poco sobre su función (Drucker et al., 2009).

Basonuclina 1 (BNC1)

La basonuclina es una proteína con dedos de cinc que presenta una distribución tisular muy reducida (Tseng, 1998). Hasta el momento se la ha detectado sobre todo en los queratinocitos basales de los epitelios escamosos estratificados (piel, epitelio bucal, esófago, vagina y córnea) y en las células gametógenas del testículo y el ovario (Tseng and Green, 1994; Weiner and Green, 1998). En estos momentos existen indicios considerables de que la basonuclina es un factor de transcripción específico de ciertos tipos celulares para los genes de ARNr (ADNr). Los dedos de cinc de la basonuclina interaccionan con tres sitios evolutivamente conservados del promotor del ADNr (Iuchi and Green, 1999; Tseng et al., 1999). La regulación epigenética a través de la metilación de CpG cumple un cometido importante en la oncogenia así como en la respuesta al tratamiento antitumoral. El BNC1 apareció hipometilado en estirpes celulares del cáncer de pulmón amicrocítico humanas H1299 que son radiorresistentes. La supresión de la expresión del ARNm del BNC1 en las células H1299 también redujo la resistencia de estas células a la radiación ionizante (Kim et al., 2010a). La metilación aberrante del ADN del BNC1 también ha sido detectada en muestras de leucemia linfocítica crónica (LLC) (Tong et al., 2010). En el carcinoma de células renales, la metilación del BNC1 apareció asociada con un pronóstico peor independientemente del tamaño, el estadio o el grado tumoral (Morris et al., 2010).

Proteína 3 portadora de motivo superhelicoidal ácido, transformante (TACC3)

La TACC3 forma un complejo con la ch-TOG (gen sobreexpresado en tumores de colon y hepáticos) y con la clatrina que entrelaza los microtúbulos en las fibras del cinetocoro. La TACC3 se expresa en ciertos tejidos proliferativos como el testículo, el pulmón, el bazo, la médula ósea, el timo y los leucocitos de sangre periférica. La expresión de TACC3 aparece alterada en algunos tipos de tumores humanos. En las células, la TACC3 está localizada en ambos centrosomas y en los microtúbulos del huso, pero no en los microtúbulos astrales (Hood and Royle, 2011).La expresión de TACC3 se ha correlacionado con la expresión de p53, y el paciente cuyos tumores expresan con profusión ambos genes presentan un pronóstico sustancialmente peor

que aquellos cuyos tumores muestran un bajo nivel de expresión con ambas inmunotinciones (P = 0,006). Se ha sugerido que el aumento de la TACC3 podría conferir una ventaja proliferativa al cáncer de pulmón amicrocítico y contribuir a la progresión del tumor, y que su expresión es un indicador pronóstico fiable del desenlace clínico en este tipo de cáncer (Jung et al., 2006). La Tacc3 podría ser un regulador negativo de la vía de señalización Notch (Bargo et al., 2010).

Similar a pecanex 3 (*Drosophila*) (PCNXL3)

La proteína similar a pecanex 3 (PCNXL3) es una proteína de membrana de múltiples pasos que pertenece a la familia de pecanex. El gen PCNXL3 se ha localizado en la región cromosómica 11q12.1-q13. Tres nuevos puntos de rotura de translocación asociados a tumores humanos se han localizado en la región cromosómica 11q13 entre los marcadores D11S4933 y D11S546. Por ello el PCNXL3 podría ser un gen patológico asociado a 11q13 (van et al., 2000).

Drosha, ribonucleasa de tipo III (DROSHA)

Drosha es una enzima ARNasa III de clase 2 responsable de iniciar el procesamiento del microARN (ARNmi) o moléculas de ARN cortas que la célula expresa de manera natural y que regulan una amplia variedad de genes interaccionando con el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para propiciar la escisión del ARN mensajero (ARNm) complementario como parte de la vía del ARNi. Se sintetiza una molécula de microARN en forma de un largo transcrito primario de ARN conocida como pri-ARNmi, que después es escindida por Drosha para producir una característica estructura en tallo y bucle de unas 70 pares de bases de longitud, conocida como pre-ARNmi (Lee et al., 2003). Drosha forma parte de un complejo proteico llamado el complejo microprocesador, que también alberga la proteína de unión a ARN bicatenario Pasha (o DGCR8) (Denli et al., 2004), que es esencial para la actividad de Drosha y es capaz de unir a fragmentos monocatenarios del pri-ARNmi que son necesarios para el correcto procesamiento (Han et al., 2006). La Drosha humana se clonó en 2000, cuando fue identificada como una ribonucleasa nuclear de ARNdc que interviene en el procesamiento de precursores del ARN ribosómico (Wu et al., 2000). Drosha fue la primera enzima ARNasa III humana descubierta y clonada. Las otras dos enzimas humanas que participan en el procesamiento y la actividad del ARNmi son las proteínas Dicer y Argonaute. Tanto Drosha como Pasha están ubicadas en el núcleo

celular, donde tiene lugar el procesamiento del pri-ARNmi que lo convierte en pre-ARNmi. Esta última molécula es procesada por la ARNasa Dicer que la convierte en microARN maduros en el citoplasma celular (Lee et al., 2003). La Drosha y otras enzimas procesadoras de microARN podrían ser importantes para el pronóstico del cáncer (Slack and Weidhaas, 2008).

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

La proteína CDC6 actúa como un regulador en las diversas etapas de la replicación del ADN. Está radicada en el núcleo durante la G1, pero se trasloca al citoplasma al inicio de la fase S. Además, se supone que la CDC6 regula la activación del punto de control de la replicación a través de la interacción con las cinasas ATR en las células eucariotas superiores (Yoshida et al., 2010). La CDC6 es esencial para la replicación del ADN y su desregulación está implicada en la carcinogenia. Se ha demostrado que la regulación a la baja de la CDC6 por ARN de interferencia (ARNi) impide la proliferación celular y promueve la apoptosis (Lau et al., 2006). La sobreexpresión de la CDC6 se ha detectado en varios tipos de cáncer. Entre los tipos de cáncer que sobreexpresan la CDC6 se hallan el cáncer gástrico (Tsukamoto et al., 2008), tumores cerebrales (Ohta et al., 2001), carcinoma epidermoide oral (Feng et al., 2008), carcinoma de cuello uterino (Wang et al., 2009) y el mesotelioma maligno (Romagnoli et al., 2009).

Desyodinasa, yodotironina, tipo II (DIO2)

La proteína codificada por el gen DIO2 pertenece a la familia de la yodotironina desyodinasa. Se expresa con profusión en la glándula tiroides, y podría contribuir notablemente al aumento relativo de la producción de T3 en la misma en los pacientes con enfermedad de Graves y adenomas tiroideos (Meyer et al., 2008); (de Souza Meyer et al., 2005)). Los patrones de expresión génica difieren significativamente entre los tipos de carcinoma rinofaríngeo (NPC) que progresan en dirección ascendente o descendente. La expresión del gen DIO2 es mayor en el de tipo descendente (= metástasis a distancia) que en el ascendente (crecimiento local e invasión de la base del cráneo), que podría estar estrechamente vinculado con el potencial metastásico del NPC (Liang et al., 2008a). El ARNm del DIO2 así como la actividad de la DIO2 están presentes en tumores cerebrales (Murakami et al., 2000).

La actividad D2 en el pulmón es semejante en el tejido periférico pulmonar y en el tejido tumoral de este órgano (Wawrzynska et al., 2003).

Miembro 26B de la familia de la cinesina (KIF26B)

Una cinesina es una proteína perteneciente a la clase de las proteínas motoras presentes en las células eucariotas. Las cinesinas se mueven a lo largo de los filamentos de microtúbulos, impulsadas por la hidrólisis del ATP (en definitiva, son ATPasas). Kif26b, un gen de la familia de las cinesinas, es una diana situada corriente abajo de Sall1 (Nishinakamura et al., 2011). Kif26b es esencial para el desarrollo renal porque regula la adhesión de las células mesenquimáticas en contacto con los primordios de los uréteres. La sobreexpresión de Kif26b *in vitro* redujo la adhesión celular a través de interacciones con la miosina no muscular (Terabayashi et al., 2012; Uchiyama et al., 2010).

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

El antígeno del carcinoma epidermoide (SCCA), también llamado SERPINB3, es un miembro de la familia de alto peso molecular de los inhibidores de las proteasas de serina (serpinas) (Suminami et al., 1991). Se han observado niveles elevados en el cáncer de cabeza y cuello y en otros tipos de cáncer epiteliales (Torre, 1998). Se ha descrito su sobreexpresión SCCA en el tejido tumoral con respecto al peritumoral, lo cual apunta a su potencial utilidad como marcador para la detección histológica del CHC (Pontisso et al., 2004). La serpina B3/B4, en concreto la serpina B4, parece cumplir un cometido importante en la proliferación aberrante del epitelio. La evaluación de la serpina B3/B4 podría tener un valor pronóstico en la predicción de la progresión de la enfermedad, sobre todo en los pacientes con predisposición al cáncer de pulmón (Calabrese et al., 2012). Por un lado, la SCCA1 (SERPINB3) inhibe la muerte celular inducida por daños lisosómicos, mientras que por el otro, sensibiliza las células al estrés del retículo endoplasmático al activar a la caspasa con independencia de la vía apoptósica del receptor de muerte (Ullman et al., 2011). Algunos hallazgos indican que la SERPINB3 juega un importante papel en la inducción de la alteración de la barrera epidérmica. La SERPINB3 podría ser un determinante crítico de la función de barrera desempeñada por la epidermis (Katagiri et al., 2010).

Cinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1)

La CDC2 (ciclo de división celular 2), también conocida como $p34^{cdc2}$ o CDK1 (cinasa 1 dependiente de ciclina), pertenece a las CDK, una familia de proteínas-cinasas de serina y treonina, y juega un papel clave en el control del ciclo celular (Vermeulen et al., 2003). La sobreexpresión de CDC2 ha sido detectada en varios tipos de cáncer, aunque según (Vermeulen et al., 2003) la expresión de otras proteínas del ciclo celular como las ciclinas aparecen desreguladas con una frecuencia aún mayor. La sobreexpresión de CDC2 ha sido descrita en el cáncer de pulmón amicrocítico (Xu et al., 2011; Zhang et al., 2011). Perumal et al. (2012) describieron que su sobreexpresión se correlacionaba con un pronóstico negativo (Perumal et al., 2012). Asimismo, otro estudio sugirió el posible uso clínico de CDC2 como predictor de la recurrencia en el cáncer de pulmón amicrocítico en estadio inicial (Kubo et al., 2014).

Colágeno, tipo XI, alfa 1 (COL11A1)

El COL11A1 codifica una de las dos cadenas alfa del colágeno de tipo XI, un colágeno fibrilar secundario. Se ha descrito la regulación al alza de COL11A1 en varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer colorrectal (Freire et al., 2014), el de mama (Ellsworth et al., 2009), el gástrico (Zhao et al., 2009b), así como en tumores vesicales (Ewald et al., 2013). La expresión de COL11A1 en el cáncer de ovario ha sido vinculada con la recidiva tumoral y una supervivencia breve. La reducción de la expresión de COL11A1 redujo la migración e invasión celular en condiciones *in vitro* así como la progresión tumoral en ratones (Cheon et al., 2014; Wu et al., 2014b). El COL11A1 se ha hallado expresado diferencialmente en el tejido pulmonar de mujeres no fumadoras con cáncer de pulmón en comparación con controles sanos, a tenor del análisis de micromatrices (Lv and Wang, 2015).

Colágeno, tipo I, alfa 2 (COL1A2)

La COL1A2 codifica la cadena pro-alfa2 del colágeno de tipo I cuya triple hélice comprende dos cadenas alfa1 y una cadena alfa2. En muestras de cáncer gástrico el COL1A2 se halló regulado al alza en comparación con el tejido normal (Yan et al., 2014; Yang et al., 2007) y estuvo relacionado con el estadio avanzado (Yasui et al., 2004). Se ha descrito asimismo su regulación al alza en el osteosarcoma (Wu et al., 2014a), en el cáncer de vejiga en estadio avanzado (Fang et al., 2013), en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello/oral (HNOSCC) (Ye et al., 2008) y en el meduloblastoma, el tumor cerebral maligno más frecuente en niños (Liang et al., 2008b).

Periostina, factor específico de osteoblastos (POSTN)

El POSTN, un gen que codifica una proteína que guarda similitudes con la familia de la fasciclina e implicada en la supervivencia celular y la angiogenia, se ha convertido en un prometedor marcador de la progresión tumoral en varios tipos de cáncer humano (Ruan et al., 2009). La expresión elevada de la proteína periostina o de su ARNm se ha detectado en muchos tumores sólidos, tales como el carcinoma de mama (Zhang et al., 2010c), colon (Kikuchi et al., 2008), cabeza y cuello (Kudo et al., 2006), páncreas (Kanno et al., 2008), tiroides papilar (Puppin et al., 2008), próstata (Tischler et al., 2010), ovario (Choi et al., 2010), pulmón (Takanami et al., 2008) e hígado (Utispan et al., 2010), así como en el carcinoma epidermoide de esófago (Kwon et al., 2009). La periostina se expresa anormalmente con profusión en el cáncer de pulmón y se ha correlacionado con la angiogenia, la invasión y la metástasis (Takanami et al., 2008). El silenciamiento de la periostina en células A549 de cáncer de pulmón amicrocítico inhibe el crecimiento y reduce la invasividad de dichas células (Wu et al., 2013c).

Proteína con motivo de unión al ADN en forma de gancho de AT, 1 (AHDC1) – Este gen codifica una proteína que contiene dos ganchos de AT, que probablemente intervienen en la unión al ADN. Las mutaciones en este gen se relacionaron con la deficiencia visual cerebral (Bosch et al., 2015). Empleando la secuenciación de todo el exoma se identificaron mutaciones de AHDC1 con versiones truncadas *de novo* en individuos con retraso del lenguaje expresivo sindrómico, hipotonía y apnea del sueño. Es muy probable que estas mutaciones causen este síndrome genético (Xia et al., 2014).

Factor inductor de la apoptosis asociado a mitocondrias, número 2 (AIFM2) – Este gen codifica una oxidorreductasa de flavoproteínas que se une al ADN monocatenario y que se cree que contribuye a la apoptosis en presencia de ADN bacteriano y vírico. La AIFM2 no ha sido bien caracterizada, si bien algunos datos indican que puede funcionar como oncosupresor. La expresión de AIFM2 se activa por el oncosupresor p53, y se ha comprobado que la expresión ectópica de p53 induce la apoptosis. Además, se demostró que la expresión de AIFM2 estaba regulada a la baja en un grupo de tumores humanos que incluían los tumores de riñón, estómago, colorrectal, y otros tipos de cánceres (Ohiro et al., 2002; Wu et al., 2004). No obstante, en un modelo de ratón con genes desactivados la AIFM2 no fue necesaria para la

oncosupresión dependiente de p53 (Mei et al., 2006). En cultivo celular, la AIFM2 está implicada en la apoptosis inducida por adenosina (Yang et al., 2011).

Marco abierto de lectura 132 del cromosoma 6 (C6orf132) – El gen C6orf132 codifica el marco abierto de lectura 132 del cromosoma 6. El gen C6orf132 se localiza en el cromosoma 6p21.1 (Mungall et al., 2003). Todavía no se conoce la función de este gen.

Homólogo de CCZ1, proteína asociada a la biogénesis y el tráfico de proteínas vacuolares (*S. cerevisiae*) (CCZ1), homólogo B de CCZ1, proteína asociada a la biogénesis y el tráfico de proteínas vacuolares (*S. cerevisiae*) (CCZ1B) – El gen CCZ1 codifica el homólogo de CCZ1, una proteína asociada a la biogénesis y el tráfico de proteínas vacuolares (*S. cerevisiae*). El CCZ1B codifica el homólogo B de CCZ1, una proteína asociada a la biogénesis y el tráfico de proteínas vacuolares (*S. cerevisiae*). Mediante estudios de proteómica comparada se identificaron CCZ1 y CCZ1B como genes humanos conservados evolutivamente en *Caenorhabditis elegans* (Lai et al., 2000). Los genes CCZ1 y CCZ1B se localizan en el cromosoma 7p22.1 (Hillier et al., 2003). CCZ1 parece actuar en la biogénesis de lisosomas y en la maduración de fagosomas reclutando la GTPasa RAB7A7 al fagosoma (Nieto et al., 2010). El gen CCZ1B no se ha caracterizado.

Colágeno, de tipo V, alfa 2 (COL5A2) – Este gen codifica una cadena alfa de uno de los colágenos fibrilares poco abundantes. Se ha comunicado que el COL5A2 aparecía regulado al alza en muestras de tejido de cáncer colorrectal en comparación con los tejidos adyacentes no cancerosos (Fischer et al., 2001). El análisis de muestras equivalentes de carcinoma ductal *in situ* (DCIS), de carcinoma ductal invasivo (IDC) y del estroma de pacientes con cáncer de mama demostró una elevada expresión de COL5A2 en el IDC (Vargas et al., 2012). En el osteosarcoma se ha descrito que el COL5A2 estaba regulado al alza y era importante para la oncogénesis (Wu et al., 2014).

Miembro 12 de la subfamilia de colectinas (COLEC12) – Este gen codifica un miembro de la familia de las C-lectinas, proteínas que poseen secuencias similares a las del colágeno y dominios de reconocimiento de carbohidratos. La proteína COLEC12 es

un receptor *scavenger*, una glucoproteína de la superficie celular que lleva a cabo varias funciones relacionadas con la defensa del huésped. Se ha propuesto que el gen COLEC12 es un posible candidato a biomarcador en el cáncer tiroideo anaplásico (Espinal-Enriquez et al., 2015). La COLEC12 se expresaba de forma diferencial en estirpes celulares BT474 de cáncer de mama positivo para HER2, y podría contribuir a la eficacia del trastuzumab (Von der Heyde et al., 2015).

Complejo de proteínas del coatómero, subunidad gamma 1 (COPG1) – El gen COPG1 codifica una subunidad proteica del complejo de coatómero 1 (COPI). Las vesículas recubiertas con COPI intervienen en el transporte retrógrado desde el aparato de Golgi hasta el RE, así como en el transporte intra-Golgi. El precursor citosólico del recubrimiento de COPI, el complejo heptamérico del coatómero, puede considerarse formado de dos subcomplejos. El primero consta de las subunidades COP beta, gamma, delta y zeta, que son homólogos lejanos de las subunidades del adaptador de clatrina AP (Watson et al., 2004). El transporte nuclear del EGFR dependiente de EGF está regulado por el tráfico retrógrado desde el aparato de Golgi hasta el RE, que comporta una asociación del EGFR con COP gamma, una de las subunidades del coatómero de COPI (Wang et al., 2010b). Mediante técnicas inmunohistoquímicas se confirmó que la COPG1 se expresaba con profusión en células endoteliales procedentes de cáncer de pulmón y en células pulmonares cancerosas (Park et al., 2008).

CSNK2A2 – La subunidad alfa prima de la caseína-cinasa II es una enzima que está codificada en los seres humanos por el gen CSNK2A. Un estudio retrospectivo puso de manifiesto que la CSNK2A1 podría ser un marcador pronóstico útil en pacientes con NSCLC (cáncer de pulmón amicrocítico) tras la resección completa, independientemente del estado de metástasis en los ganglios linfáticos (Wang et al., 2010c). Se ha vinculado la CSNK2A2 con la progresión del tumor en fases avanzadas del cáncer colorrectal en seres humanos (Nibbe et al., 2009).

Proteína de siete dominios transmembranarios expresada en células dendríticas (DCSTAMP) – Este gen codifica una proteína transmembranaria de siete pasos, que se expresa principalmente en las células dendríticas. La proteína codificada está implicada en diversas funciones inmunológicas realizadas por las células dendríticas.

Se ha descrito que la DCSTAMP se expresa de forma diferencial en el carcinoma tiroideo papilar (Lee et al., 2009), y posteriormente se confirmó que se expresa profusamente en estas muestras (Kim et al., 2010).

Disqueratosis congénita 1, disquerina (DKC1) – El gen DKC1 funciona en dos complejos distintos. La disquerina participa tanto en la modificación de uridina en el ARN ribosómico y el ARN nuclear pequeño como en la estabilización del componente de ARN de la telomerasa (TERC). En tumores humanos se ha comprobado que la expresión de la disquerina estaba relacionada tanto con la modificación del ARNr como con los niveles de TERC (Penzo et al., 2015). Además, la sobreexpresión de disquerina se ha vinculado con un pronóstico desfavorable en diversos tipos de tumores, p. ej.: en el HCC (Liu et al., 2012).

Cinasa de doble especificidad regulada por fosforilación de tirosina (Y), número 2 (DYRK2)/ cinasa de doble especificidad regulada por fosforilación de tirosina (Y), número 4 (DYRK4) – La DYRK2 y la DYRK4 pertenecen a la familia Dyrk de proteína-cinasas (en los mamíferos la familia consta de 5 miembros), que participan en la regulación de la diferenciación, proliferación y supervivencia celular (Papadopoulos et al., 2011). La DYRK2 controla la transición epitelio-mesénquima en el cáncer de mama mediante la degradación de la proteína *Snail* (Mimoto et al., 2013). La DYRK2 regula la inducción de la apoptosis debida a p53 y aumenta la respuesta a los daños en el ADN: tras la exposición a condiciones genotóxicas, la DYRK2 se traslada al núcleo y activa el p53 por fosforilación (Meulmeester and Jochemsen, 2008; Taira et al., 2007). El gen DYRK4 se localiza en el cromosoma 12p13.32, que es una zona descrita como locus de susceptibilidad al CRC, ya que incluye el gen CCND2 (Jia et al., 2013; Peters et al., 2013). Algunos estudios han señalado una función de la DYRK4 en la diferenciación neuronal (Leypoldt et al., 2001; Slepak et al., 2012).

Similar a ERO1 (*S. cerevisiae*) ERO1L – La proteína alfa similar a ERO1 está codificada en los seres humanos por el gen ERO. La ERO1-α es una enzima oxidante presente en el retículo endoplásmico, que se induce en condiciones de hipoxia. La ERO1-α está sobreexpresada en diversos tipos de tumores. Además, la ERO1-α relacionada con el cáncer regula la expresión de la molécula de MHC de clase I mediante plegamiento oxidativo (Kukita et al., 2015). Se ha propuesto que la expresión

de hERO1-α en células cancerosas está vinculada a un pronóstico malo, por lo que puede ser un factor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama (Kutomi et al., 2013). En los tumores humanos naturales, el ARNm del ERO1L se indujo específicamente en microentornos hipóxicos con regulación al alza simultánea de la expresión del VEGF. Se ha demostrado que la reducción de la producción de ERO1L mediante ARNpi da lugar a una inhibición significativa de la secreción de VEGF, una alteración de la capacidad de proliferación y un aumento de la apoptosis (May et al., 2005).

Familia con similitud de secuencia 83, miembro A (FAM83A) – Se ha comprobado que el nivel de la FAM83A era elevado en varios tipos de tejidos cancerosos (Cipriano et al., 2014). Sin embargo, sigue sin estar clara la función de la FAM83A (Boyer et al., 2013). Se ha predicho que la FAM83A sería un gen específico de tumor en el cáncer de pulmón, y su expresión en muestras de cáncer de pulmón se ha confirmado de forma experimental. La expresión fue especialmente elevada en el adenocarcinoma (Li et al., 2005). Otros autores han descrito una correlación con la progresión del cáncer de pulmón (Liu et al., 2008).

Retraso mental asociado al cromosoma X frágil, homólogo autosómico 1 (FXR1) – La proteína codificada por el gen FXR1 es una proteína de unión al ARN que interacciona con las proteínas FMR1 y FXR2, que son similares desde el punto de vista funcional. La regulación del FXR1 está alterada en diversos trastornos de los seres humanos, incluido el cáncer. El FXR1 actúa como un oncogén, lo que podría aumentar la proliferación, la migración y la invasión de las células cancerosas (Jin et al., 2015). El FXR1 es un nuevo gen asociado al cáncer en el caso del NSCLC, y lleva a cabo su función reguladora mediante la formación de un nuevo complejo con otros dos oncogenes, la proteína-cinasa C, iota (PRKCI) y el factor transformante de las células epiteliales 2 (ECT2) dentro del mismo amplicón en las células de cáncer de pulmón (Qian et al., 2015b). Se ha descrito que el aumento de la expresión de FXR1 en el NSCLC es un candidato a biomarcador que sería indicativo de un mal pronóstico, por lo que podría representar una nueva diana terapéutica. Además, la expresión de FXR1 está relacionada con un desenlace clínico desfavorable en muchos cánceres humanos, lo que apunta a un amplio papel de esta proteína de unión al ARN en la progresión del cáncer (Qian et al., 2015a).

Ubiquitina-proteína-ligasa E3 específica de la fase G2/M (G2E3) – La ubiquitina-proteína-ligasa E3 específica de la fase G2/M es una enzima que está codificada en los seres humanos por el gen G2E. La G2E3 se transporta entre el citoplasma y el núcleo, se concentra en los nucleolos y se traslada al nucleoplasma en respuesta a daños en el ADN. La G2E3 es una ubiquitina-ligasa de función doble que es esencial para la prevención de la apoptosis en las fases tempranas de la embriogénesis (Brooks et al., 2008). Algunos resultados apuntan a que la G2E3 es un determinante molecular de la respuesta a los daños en el ADN y la supervivencia celular, y la pérdida de esta proteína hace a las células tumorales más sensibles al tratamiento que daña el ADN (Schmidt et al., 2015b). Además, la pérdida de G2E3 provocaba la apoptosis y disminuía la proliferación de células cancerosas. Por tanto, la G2E3 actúa como un factor de supervivencia (Schmidt et al., 2015a).

Proteína de unión a guanilato, número 5 (GBP5) – La proteína humana de unión a guanilato, número 5 (hGBP5) pertenece a la familia de las GTPasas grandes inducibles con interferón gamma, que son bien conocidas por su elevada inducción en respuesta a citocinas proinflamatorias (Wehner and Herrmann, 2010). La hGBP5 existe en tres variantes de corte y empalme, que forman dos proteínas distintas, de las cuales la específica de tumores es la que tiene 97 aminoácidos eliminados del extremo C-terminal (Fellenberg et al., 2004).

Glutaminasa (GLS) – El gen GLS codifica la glutaminasa mitocondrial de tipo K. La glutaminasa (GLS) convierte la glutamina en glutamato, y desempeña un papel fundamental en el metabolismo, el crecimiento y la proliferación de las células cancerosas. Algunos estudios demuestran que la GLS es necesaria para la oncogénesis, y apuntan a posibles estrategias de tratamiento del cáncer basadas en la inhibición genética, y también con moléculas pequeñas, de la GLS, y que tienen como diana la dependencia de GLS autónoma de las células cancerosas (Xiang et al., 2015). La desactivación genética transitoria de variantes de corte y empalme de la GLS demostró que la pérdida de GAC daba lugar al efecto deletéreo más acusado en el crecimiento de las células cancerosas del NSCLC (Van den Heuvel et al., 2012). La expresión de GLS1 está regulada al alza y correlaciona con factores de patología clínica en el cáncer colorrectal (Huang et al., 2014a), el carcinoma hepatocelular

(HCC) (Yu et al., 2015) y los adenocarcinomas ductales de páncreas (PDA) (Chakrabarti et al., 2015).

Proteína de choque térmico de 70 KDa, número 2 (HSPA2) – La HSPA2 se ha descrito como posible proteína oncógena, que se expresa a niveles anómalos en un subconjunto de cánceres humanos, tales como el cáncer de mama (Mestiri et al., 2001), el cáncer de cuello uterino (Garg et al., 2010a), el cáncer urotelial de vejiga (Garg et al., 2010c), el carcinoma nasofaríngeo (Jalbout et al., 2003) y otros tumores malignos (Chouchane et al., 1997). También se observó cierto nivel de actividad del gen HSPA2 en estirpes celulares procedentes de varios cánceres humanos (Scieglinska et al., 2008), en tanto que el silenciamiento del gen HSPA2 en células cancerosas dio lugar a la detención del crecimiento y a una disminución de la capacidad oncogénica (Rohde et al., 2005; Xia et al., 2008). Además, el polimorfismo del gen HSPA2 está vinculado a un aumento del riesgo de aparición de cáncer de pulmón (Wang et al., 2010a). La sobreexpresión de HSPA2 correlaciona con un aumento de la proliferación celular, escasa diferenciación y metástasis ganglionares en cánceres humanos de mama, de cuello uterino y uroterial de vejiga (Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010c; Mestiri et al., 2001).

Proteína de choque térmico de 70 KDa, número 8 (HSPA8) – El gen HSPA8 codifica un miembro de la familia Hsc70 de proteínas de choque térmico 70, que incluye tanto miembros de expresión constitutiva como termoinducibles. La HSPA8 se une a los polipéptidos nacientes para facilitar el correcto plegamiento de las proteínas (Beckmann et al., 1990). Las Hsc70 actúan como chaperonas moleculares facilitando la síntesis, el plegamiento, el ensamblaje y el tránsito de las proteínas entre los compartimentos celulares, así como su degradación (Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). La Hsc70 se expresa tanto en células mamarias no malignas como en células de cáncer de mama (Kao et al., 2003; Vargas-Roig et al., 1998) y la sobreexpresión de Hsp/hsc70 en células cancerosas quimiorresistentes (Ciocca et al., 1992; Lazaris et al., 1997) ha motivado la realización de estudios sobre el posible papel de estas proteínas como marcadores clínicos (Ciocca and Calderwood, 2005). La forma segregada de esta chaperona hsc70 puede estar implicada en la proliferación celular, lo que podría explicar el aumento del ritmo de crecimiento de las células cancerosas que sobreexpresan la catepsina D (Nirde et al., 2010). Además,

Ruisin y cols. describieron una asociación entre un polimorfismo de este gen y el riesgo de cáncer de pulmón (Rusin et al., 2004).

Proteína de choque térmico de 70 KDa, número 1A (HSPA1A) – Se comprobó que la HSPA1A, también conocida como HSP72, estaba muy regulada al alza en el cáncer, y que desempeñaba un papel fundamental en el crecimiento de las células tumorales a través de la inhibición de las rutas de senescencia dependientes de p53 e independientes de p53 (Sherman, 2010). Se ha descrito su sobreexpresión en el caso del RCC (Atkins et al., 2005) y de los carcinomas gastrointestinales (Wang et al., 2013a), y en este último caso se halló una correlación significativa con la progresión, la infiltración y la presencia de metástasis en zonas remotas y en los ganglios linfáticos.

Proteína de choque térmico de 70 KDa, número 1B (HSPA1B) – El gen HSPA1B, también conocido como HSP70-2, codifica la proteína de choque térmico 70-2 específica de testículo, que es esencial para el crecimiento de los espermatocitos y de las células cancerosas (Hatfield and Lovas, 2012). Diferentes estudios indican que la HSP70-2 desempeña un papel importante en la progresión del cáncer de cuello uterino (Garg et al., 2010b), el carcinoma de células renales (Singh and Suri, 2014) y el cáncer de vejiga urinaria, y los polimorfismos de este gen están relacionados con el desarrollo de cáncer gástrico (Ferrer-Ferrer et al., 2013). Algunas variantes funcionales de HSPA1B están vinculadas con el riesgo de cáncer de pulmón y la tasa de supervivencia. Estas variantes genéticas de Hsp70 pueden servir como biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer de pulmón y su pronóstico (Szondy et al., 2012; Guo et al., 2011).

Similar a la proteína de choque térmico de 70 KDa, número 1 (HSPA1L) – La proteína de choque térmico de 70 KDa 1L es una proteína que está codificada en los seres humanos por el gen HSPA1L, que está situado en el cromosoma 6. Aunque comparte una importante homología con HSPA1A y HSPA1B, está regulada de forma diferente y no es termoinducible (Ito et al., 1998). Los polimorfismos de este gen están relacionados con la susceptibilidad al cáncer de próstata y su pronóstico (Sfar et al., 2010), así como con la susceptibilidad al carcinoma hepatocelular (Medhi et al., 2013).

Proteína de choque térmico de 70 KDa, número 6 (HSP70B') (HSPA6) – La proteína de choque térmico (Hsp) 70B' es una chaperona Hsp70 humana que es exclusivamente inducible, presentando niveles de expresión basal escasos o nulos en la mayoría de las células (Noonan et al., 2007). Se demostró que la HSPA6, también conocida como proteína de choque térmico 70B', estaba regulada al alza por el tratamiento con Y15 en células de glioblastoma (Huang et al., 2014b) y por el choque térmico en células de cáncer de cabeza y cuello (Narita et al., 2002). Es posible que los niveles elevados de HSPA6 estén relacionados con las recidivas tempranas del HCC (Yang et al., 2015).

Proteína de choque térmico de 70 KDa, número 7 (HSP70B) (HSPA7) – El HSPA7 es un pseudogén.

Proteína de unión a HSPA (choque térmico, 70 kDa), co-chaperona citoplasmática 1 (HSPBP1) – La proteína HspBP1 de unión a proteínas de choque térmico es un miembro de la familia Hsp70 de chaperonas. La HspBP1 es una co-chaperona que se une a la chaperona Hsp70 y la regula. Los niveles de HspBP1 y de Hsp70 fueron significativamente mayores en los sueros de pacientes con cáncer de mama que en los sueros de individuos normales (Souza et al., 2009). La HSPBP1 aparecía sobreexpresada en pacientes con leucemia (Sedlackova et al., 2011). La HspBP1 estaba regulada al alza en el HCV-HCC humano, y este aumento estaba relacionado con un incremento de los niveles de Hsp70 (Yokoyama et al., 2008).

Proteína activadora de GTPasa con motivo IQ, número 1 (IQGAP1) – La IQGAP1, también conocida como p195, es una proteína expresada de forma ubicua, que está codificada en los seres humanos por el gen IQGAP1. La IQGAP1 es un mediador fundamental en varios procesos celulares, en especial en las reordenaciones del citoesqueleto. Los estudios recientes apuntan a un posible papel de la IQGAP1 en el cáncer, basado en la sobreexpresión y la localización diferencial en membranas de la IQGAP1 observados en varios tumores (Johnson et al., 2009). La sobreexpresión de IQGAP1 puede desempeñar un papel importante en la aparición y la progresión del cáncer de páncreas (Wang et al., 2013c). La inhibición de la expresión de IQGAP1 redujo el crecimiento, la migración y la invasión de las células tumorales de carcinoma epidermoide de esófago (ESCC) (Wang et al., 2014c). Además, el aumento de la

expresión de IQGAP1 durante la diferenciación de las células similares a células madre del cáncer de ovario (CSC-LC) está relacionado con un comportamiento agresivo de las células, que puede contribuir a la formación de metástasis de cáncer de ovario (Huang et al., 2015a).

Integrina, beta 6 (ITGB6) – La ITGB6 es un subtipo de integrina que se expresa exclusivamente en la superficie de las células epiteliales, y constituye un receptor para las proteínas de la matriz extracelular (Weinacker et al., 1994). En un estudio se describió el aumento de la expresión de ITGB6 en 10 tipos de tumores humanos estudiados en comparación con los tejidos normales. La máxima frecuencia de expresión de la ITGB6 se notificó en el caso de los carcinomas epidermoides del cuello uterino, la piel, el esófago, y la cabeza y el cuello. Hay que señalar que el bloqueo de ITGB6 mediado por anticuerpos inhibió la progresión del tumor *in vivo* (Van Aarsen et al., 2008). La ITGB6 se ha utilizado como diana para el suministro de fármacos específicos del tumor y para aumentar la eficacia terapéutica en el carcinoma de colon (Liang et al., 2015; Zhao-Yang et al., 2008). En el cáncer de mama, la expresión elevada del ARNm o de la proteína ITGB6 se relacionó con una perspectiva de supervivencia muy mala y con un aumento de las metástasis en zonas alejadas. Un anticuerpo dirigido contra la ITGB6 inhibió el crecimiento del tumor en modelos de cáncer de mama en ratones (Allen et al., 2014).

Desmetilasa 6B específica de lisina (K) (KDM6B) – La KDM6B, también conocida como JMJD3, es una histona-desmetilasa que está codificada en los seres humanos por el gen KDM6B. La KDM6B afecta a la regulación transcripcional a través de la desmetilación del residuo de lisina 27 de la histona 3. La baja expresión de la KDM6B fue un factor predictor independiente de un mal pronóstico (P = 0,042) en pacientes con CRC tratados con resección quirúrgica. Además, la sobreexpresión de KDM6B inhibió el crecimiento celular a través de la iniciación de la apoptosis dependiente de mitocondrias y la atenuación de la cascada invasión-metástasis en células de NSCLC (Ma et al., 2015). Por otro lado, la KDM6B presenta un nivel elevado de expresión en el carcinoma de riñón de células claras (ccRCC) y correlaciona de forma positiva con un mal pronóstico del ccRCC. La desactivación genética del KDM6B logró inhibir la oncogénesis del ccRCC *in vitro* (Li et al., 2015). Además, la desregulación de KDM6B

puede contribuir a la génesis de gliomas a través de la inhibición de la ruta del p53, que da lugar a un bloqueo de la diferenciación terminal (Ene et al., 2012).

Queratina 9, de tipo I (KRT9) – La queratina 9 es una citoqueratina de tipo I que está codificada en los seres humanos por el gen KRT9. Solo está presente en la epidermis diferenciada de forma terminal de las palmas de las manos y las plantas de los pies. Las mutaciones en el gen que codifica esta proteína provocan queratodermia palmoplantar epidermolítica (Reis et al., 1994). La KRT9 estaba regulada al alza en el HCC. Esta sobreexpresión puede desempeñar un papel fundamental en la formación de metástasis de HCC, y puede utilizarse como posible marcador sérico para predecir las metástasis del HCC (Fu et al., 2009).

Elemento retrotransponible LINE1 número 1 (L1RE1) – El gen L1RE1, también conocido como LRE1, codifica un elemento retrotransponible “LINE” (siglas inglesas de *Long Interspersed Nuclear Element*, elemento nuclear intercalado largo), o LRE, una secuencia de ADN móvil con actividad autónoma de retrotransposón. Se ha descrito que la familia de retrotransposones LINE1 está hipometilada en muchos cánceres y refleja el estado global de metilación en el genoma (Ostertag and Kazazian, Jr., 2001). Una región repetida del elemento nuclear intercalado largo, LRE1, situada en la posición 22q11-q12, es un indicador fiable del estado global de metilación (Chalitchagorn et al., 2004; Ostertag and Kazazian, Jr., 2001). Algunos resultados indican que la metilación relativa de LRE1 es un biomarcador epigenético independiente del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC) (Hsiung et al., 2007).

Laminina, beta 3 (LAMB3) – El gen LAMB3 codifica la subunidad beta 3 de la laminina, que junto con las subunidades alfa y gamma forma la laminina 5. La LAMB3 estaba regulada al alza en el carcinoma papilar tiroideo (PTC) (Barros-Filho et al., 2015), en el carcinoma epidermoide de cuello uterino (SCC de cuello uterino) (Yamamoto et al., 2013) y en el carcinoma epidermoide bucal (OSCC) (Tanis et al., 2014). Los análisis con matrices de genes y técnicas bioinformáticas apuntaron a un papel crucial del gen LAMB3 en el cáncer de pulmón. La desactivación de este gen inhibió la invasión y las metástasis de células de cáncer de pulmón humano *in vitro* e *in vivo*. El LAMB3

aparecía sobreexpresado en pacientes con cáncer de pulmón, y su expresión se correlacionaba con metástasis en los ganglios linfáticos (Wang et al., 2013b).

Proteína transmembranaria lisosómica, número 5 (LAPTM5) – El gen LAPTM5 codifica una proteína de membrana de las vesículas intracelulares que está asociada a los lisosomas. La LAPTM5 está metilada de forma aberrante en el cáncer de pulmón, y la metilación se correlacionó con el estado de diferenciación del tumor (Cortese et al., 2008). La acumulación de vesículas positivas para LAPTM5 estaba estrechamente relacionada con la muerte celular programada que tenía lugar durante la regresión espontánea de neuroblastomas (Inoue et al., 2009). La proteína CD1e participa en la presentación de antígenos lipídicos a las células de dendríticas. La LATPM5 controla o bien la ubiquitinación de CD1e o bien la generación de proteínas CD1e lisosómicas solubles (Angenieux et al., 2012).

Componente 4 del complejo de mantenimiento de minimicrosomas (MCM4) – La proteína codificada por el gen MCM4 es una de las proteínas de mantenimiento de minimicrosomas (MCM), que están muy conservadas y que son esenciales para la iniciación de la replicación del genoma en eucariotas. La MCM4 estaba regulada a la baja en el cáncer de vejiga (Zekri et al., 2015) y se expresaba de forma diferencial en el adenocarcinoma de pulmón en comparación con los tejidos normales del pulmón (Zhang et al., 2014). La sobreexpresión de MCM4 se ha relacionado con una supervivencia más corta en pacientes con cáncer de mama (Kwok et al., 2015).

Componente 5 del complejo de mantenimiento de minimicrosomas (MCM5) – El MCM5 participa en la replicación del ADN y en la regulación del ciclo celular. Se ha comprobado que los niveles elevados de expresión de MCM5 están vinculados a la progresión de la enfermedad y a un peor pronóstico del carcinoma epidermoide bucal (Yu et al., 2014), el cáncer de cuello uterino (Das et al., 2013), el cáncer gástrico (Giaginis et al., 2011) y el cáncer de colon (Burger, 2009).

Melanorregulina (MREG) – La MREG participa en la distribución intracelular de melanosomas (Wu et al., 2012) a través de la regulación del transporte retrógrado de melanosomas dependiente de microtúbulos (Ohbayashi et al., 2012). Además, la MREG también interviene en la regulación de la incorporación de pigmentos a los

melanosomas (Rachel et al., 2012). Se comprobó que la MREG era la diana del ARNmi-26 en su UTR situada en el extremo 3' en células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógenos. No obstante, no pudo demostrarse una participación directa de la MREG en la proliferación celular mediada por el ARNmi-26 (Tan et al., 2014).

Modulador NODAL 1 (NOMO1) / modulador NODAL 2 (NOMO2) / modulador NODAL 3 (NOMO3) – Los genes NOMO1, NOMO2 y NOMO3 son tres genes muy similares presentes en una región de duplicación situada en el brazo p del cromosoma 16. Estos tres genes codifican proteínas estrechamente relacionadas que quizá realizan la misma función. NOMO1 se identificó como gen sobreexpresado en la estirpe celular HuT78 de linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL) (Lange et al., 2009). NOMO1 es un antagonista de la ruta de transmisión de señales *Nodal*. Los miembros del grupo *Nodal* son factores de transmisión de señales pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGFbeta), que llevan a cabo una función esencial en el desarrollo de vertebrados (Haffner et al., 2004).

Nucleoporina de 153 kDa (NUP153) – Se ha relacionado a la nucleoporina 153 (Nup153), un componente del complejo del poro nuclear (NPC), con la interacción entre el NPC y la lámina nuclear. La pérdida de Nup153 provoca un reordenamiento del citoesqueleto espectacular que reduce la migración de las células de carcinoma de mama humano (Zhou and Pante, 2010). La nucleoporina NUP153 regula la distribución de proteínas específicas entre el núcleo y el citoplasma; aquí se incluye, curiosamente, el transductor de señales del TGFβ, SMAD2 (Xu et al., 2002). Recientemente, algunos análisis han puesto de manifiesto posibles funciones oncógenas nuevas de la nucleoporina NUP153 (al parecer a través de la modulación de la transmisión de señales del TGFβ) en el cáncer de páncreas (Shain et al., 2013).

PERP, efector de la apoptosis TP53 (PERP) – El PERP es un gen regulado por p53/p63 que codifica una proteína de los desmosomas que tiene una función esencial en la adhesión entre células y la oncosupresión. La pérdida de la expresión de PERP se correlaciona con la transición al carcinoma epidermoide (SCC) y con el aumento de la recidivas locales en pacientes con SCC de la cavidad bucal (Kong et al., 2013). La expresión de PERP aparecía reducida en muchas estirpes celulares de cáncer de

mama humano (Dusek et al., 2012). Algunos estudios indicaban que la deficiencia de Perp promovía el cáncer debido al aumento de la supervivencia celular, la pérdida de los desmosomas, y la inflamación (Beaudry et al., 2010). La PERP es una diana de p53 relacionada con la apoptosis, y su activación sola es suficiente para inducir la ruta de apoptosis que conduce a la muerte celular (Chen et al., 2011).

Factor de transcripción con posible homeodominio, número 1 (PHTF1) / factor de transcripción con posible homeodominio, número 2 (PHTF2) – El PHTF1 (factor de transcripción con posible homeodominio) es un gen con una posible homeosecuencia situado en el locus 1p11-p13 del genoma humano. Este gen está conservado evolutivamente y se expresa principalmente en los testículos (Manuel et al., 2000). El gen PHTF1 es un factor de transcripción, por lo que interviene principalmente en procesos tales como la transcripción dependiente de ADN y la regulación de procesos biológicos. La sobreexpresión de PHTF1 es responsable de la regulación de la proliferación celular y la apoptosis en estirpes celulares de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL). El PHTF1 puede ser un gen similar a los oncosupresores y una diana terapéutica para desencadenar la ruta de apoptosis con PHTF1-FEM1b-Apaf-1 (Huang et al., 2015b).

El factor de transcripción con posible homeodominio, número 2, es una proteína que está codificada en los seres humanos por el gen PHTF2. La PHTF2 se expresa principalmente en el músculo, y se localiza en el locus 7q11.23-q21 del genoma humano (Manuel et al., 2000).

Proteína con dominio homólogo al de la pleckstrina, familia M (con dominio RUN) miembro 1 (PLEKHM1) – La proteína codificada por el gen PLEKM1 es esencial para la resorción ósea y puede tener una función crítica en el transporte de vesículas en los osteoclastos. Las mutaciones en este gen están vinculadas con la osteopetrosis autosómica recesiva de tipo 6 (OPTB6) (Van et al., 2004). Se ha propuesto que la PLEKHM1 es un candidato a gen de susceptibilidad al cáncer epitelial de ovario (Permuth-Wey et al., 2013).

Proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) – La proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) desempeña un papel importante en la regulación de la inflamación.

Algunos resultados indican que la PLTP tiene propiedades antiinflamatorias en los macrófagos (Vuletic et al., 2011). Además, la PLTP es un mediador esencial en la asociación del triacil-lípido A con las lipoproteínas, que da lugar a la extensión de su tiempo de residencia y a un aumento de sus propiedades proinflamatorias y antineoplásicas (Gautier et al., 2010). La PLTP se expresó de forma diferencial en pacientes con cáncer de mama, y puede estar relacionada con la respuesta a la quimioterapia (Chen et al., 2012).

Proteína-fosfatasa 2, subunidad reguladora B", alfa (PPP2R3A) – Este gen codifica una de las subunidades reguladoras de la proteína-fosfatasa 2. La proteína-fosfatasa 2 (anteriormente llamada de tipo 2A) es una de las cuatro Ser/Thr-fosfatasas principales y participa en el control negativo del crecimiento y la división celulares (Ruediger et al., 2001). La PPP2R3A aparecía con frecuencia metilada en la leucemia linfoblástica aguda (ALL) infantil (Dunwell et al., 2009).

Homólogo de la proteína-fosfatasa PTC7 (*S. cerevisiae*) (PPTC7) – El gen PPTC7 codifica el homólogo de la proteína-fosfatasa PTC7, y se localiza en el cromosoma 12q24.11. El PPTC7 ha sido identificado recientemente como un nuevo gen de susceptibilidad en la respuesta a los componentes tóxicos del medio ambiente (Zhu et al., 2015).

Polipéptido catalítico de la proteína-cinasa activada por ADN (PRKDC) – La PRKDC codifica la subunidad catalítica de la proteína-cinasa dependiente de ADN (ADN-PK), un miembro de la familia de cinasas PI3/PI4. Se ha demostrado que la PRKDC puede estabilizar la oncoproteína c-Myc a través de la ruta Akt/GSK3 (An et al., 2008). La activación de la PRKDC se correlaciona de forma positiva con la proliferación, la inestabilidad genómica y la densidad de microcapilares del HCC, y se correlaciona de forma negativa con la apoptosis y la supervivencia de los pacientes (Evert et al., 2013).

Subunidad alfa 4 del proteasoma (prosoma, macropaína) (PSMA4) – El gen PSMA4 codifica la subunidad alfa 4 del proteasoma, que degrada péptidos mediante un proceso dependiente de ATP/ubiquitina en una ruta no lisosómica. Los polimorfismos de un solo nucleótido en el gen PSMA4 se han vinculado con el riesgo de cáncer de pulmón en la etnia china Han (Wang et al., 2015). Por otra parte, se ha descrito que

los polimorfismos de un solo nucleótido en el gen PSMA4 no contribuyen de forma importante a la susceptibilidad al cáncer de pulmón amicrocítico (Yongjun Zhang et al., 2013). Además, se observó más sobreexpresión de PSMA4 en tumores de pulmón que en tejidos pulmonares normales. La regulación a la baja de la expresión de PSMA4 disminuyó la actividad del proteasoma y provocó la apoptosis (Liu et al., 2009).

Proteína-tirosina-fosfatasa, de tipo no receptor, número 13 (PTPN13) – Este gen codifica un miembro de la familia de proteína- tirosina-fosfatasas (PTP). Las PTP son moléculas que participan en la transducción de señales y regulan diversos procesos celulares, incluidos el crecimiento, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncógena de las células. Se ha determinado que la PTPN13 interacciona con el receptor Fas, por lo que podría intervenir en la muerte celular programada mediada por Fas. Además, la PTPN13 interacciona con la proteína activadora de GTPasas, y, por ello, podría funcionar como un regulador de la ruta de transmisión de señales de Rho. Los efectos de la PTPN13 en las neoplasias hematológicas son contradictorios: promueve la supresión del crecimiento tumoral en el caso del linfoma, mientras que estimula el crecimiento tumoral en el caso de la leucemia mieloide (Wang et al., 2014b). Esto puede explicarse por la capacidad de PTPN13 para contrarrestar la actividad de las tirosina-cinasas oncogénicas, y su interacción inhibitoria con el receptor de muerte Fas (Freiss and Chalbos, 2011). En el cáncer de mama, la PTPN13 se consideró un marcador único de la respuesta del tumor de mama a los antiestrógenos y una posible diana terapéutica para activar los estímulos que conducen a la apoptosis en las células tumorales (Freiss et al., 2004). La inhibición de la unión Fas/PTPN13 podría proporcionar una buena diana para el desarrollo de fármacos antineoplásicos (Takahashi and Kataoka, 1997).

Proteína activadora de RAS/p21, número 2 (RASA2) – La proteína activadora de RAS/p21, número 2, codifica un miembro de la familia GAP1 de proteínas activadoras de GTPasas. Cuando actúa como inhibidor de la función de RAS, la RASA2 aumenta la escasa actividad GTPasa intrínseca de las proteínas RAS, con lo que se obtiene la forma inactiva de RAS, unida a GDP, y se permite de este modo el control de la proliferación y diferenciación celulares. En función de la alteración genética concreta, su localización en el gen y los efectos que ejerce sobre la función de las proteínas, la RASA2 puede funcionar en teoría como un oncogén o como un gen oncosupresor

(Friedman, 1995). En condiciones de estrés moderadas la RASA2 es escindida por la caspasa-3 para dar lugar a un fragmento llamado N, que estimula la transducción de señales que se oponen a la muerte. Cuando sigue aumentando la actividad de la caspasa-3 se genera un fragmento, llamado N2, que ya no protege a las células. Por otro lado, la RASA2 de longitud completa favorece la actividad de Akt al protegerla de las fosfatasas desactivadoras (Cailliau et al., 2015). En el cáncer de mama, la caspasa-3 activada por el estrés puede contribuir a la supresión de las metástasis mediante la generación del fragmento N2 (Barras et al., 2014). La RASA2 se identificó como un gen oncosupresor mutado en el 5% de los melanomas (Arafeh et al., 2015).

Proteína de unión a la señal de recombinación de la región J de la inmunoglobulina kappa (RBPJ) – La proteína de unión a la señal de recombinación de la región J de la inmunoglobulina kappa codifica un regulador de la transcripción importante en la ruta de transmisión de señales de *Notch*. La RBPJ actúa como un represor cuando no está unida a las proteínas *Notch* y como un activador cuando está unida a las proteínas *Notch*. Se cree que funciona reclutando complejos que remodelan la cromatina, y que contienen las proteínas histona-desacetilasa o histona-acetilasa, hasta los genes de la ruta de transmisión de señales de *Notch*. En modelos de xenoinjerto con ratones se comprobó que la desactivación genética de RBPJ inhibía la capacidad oncogénica y disminuía el volumen de los tumores, lo que indica que la hipoxia promueve la transcripción de la proteína *Smoothened* mediante la regulación al alza de RBPJ, lo que induce la proliferación, la invasividad y la oncogénesis en el cáncer de páncreas (Onishi et al., 2016). La disminución significativa del crecimiento celular observada con la desactivación genética de RBPJ también se halló en las células de cáncer de próstata y de cáncer de pulmón, lo que indica que la expresión de RBPJ podría constituir una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer en los seres humanos (Xue et al., 2015; Lv et al., 2015). Además, la sobreexpresión de RBPJ fomentó el crecimiento, independiente del anclaje, de células de rabdomiosarcoma (Nagao et al., 2012). La transmisión de señales de *Notch* mediada por RBPJ es también esencial para las respuestas inmunitarias contra los tumores dependientes de las células dendríticas (Feng et al., 2010).

Proteína similar a la que contiene el dominio con motivo alfa estéril, número 9 (SAMD9L) – El gen SAMD9L, que se ubica en el cromosoma 7q21.2, codifica la

proteína similar a la que contiene el dominio con motivo alfa estéril, número 9. Los genes SAMD9 y SAMD9L comparten una estructura genética común y codifican proteínas con una identidad en los aminoácidos del 60%, y se ha propuesto que desempeñan un papel en la supresión de las rutas inflamatorias. La SAMD9L se localiza en los endosomas tempranos y actúa como un facilitador de la fusión de endosomas. La haploinsuficiencia del gen SAMD9L contribuye a la transformación mieloide, y la SAMD9L se identificó como candidato a gen oncosupresor de tumores mieloides (Nagamachi et al., 2013). La desactivación genética de SAMD9L aumentó significativamente la proliferación celular y la formación de colonias de estirpes celulares de carcinoma hepatocelular, mientras que el silenciamiento de la SAMD9L facilitó la transición G1-S de la progresión del ciclo celular y dio lugar a una elevación de la actividad de la ruta Wnt/beta-catenina. Los resultados recientes han puesto de manifiesto la capacidad oncosupresora de la inactivación de SAMD9L mediante mutaciones somáticas y la disminución de su expresión en cánceres humanos (Wang et al., 2014a). La SAMD9L se expresaba de forma significativamente reducida en poblaciones de linfocitos T y B de pacientes con melanoma metastásico, en comparación con los de los individuos controles sanos (Critchley-Thorne et al., 2007).

Subunidad 3 del factor de corte y empalme 3b, de 130 kDa (SF3B3) – El gen SF3B3 codifica la subunidad 3 del complejo de proteínas del factor de corte y empalme 3b. La sobreexpresión de SF3B3 se correlaciona de forma significativa con la supervivencia global y con la resistencia endocrina en el cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos (Gokmen-Polar et al., 2015).

Proteína tensioactiva A1 (SFTPA1) / proteína tensioactiva A2 (SFTPA2) – Estos genes codifican proteínas tensioactivas del pulmón que son miembros de una subfamilia de lectinas de tipo C llamadas colectinas. Las SFTPA se unen de forma específica a las cadenas de carbohidratos presentes en los lípidos y en la superficie de los microorganismos, y desempeñan una función esencial en la homeostasis de las propiedades tensioactivas, así como en la defensa contra los patógenos respiratorios. Las mutaciones en estos genes están vinculadas con la fibrosis pulmonar idiopática. Una firma genética específica de cáncer de pulmón, que incluía los genes SFTPA1 y SFTPA2, distinguía con precisión las muestras de cáncer de pulmón de las de otros cánceres (Peng et al., 2015). Las mutaciones del gen EGFR

fueron significativamente más frecuentes en el adenocarcinoma pulmonar que expresaba SFTPA que en aquellos en los que no se daba tal expresión (Jie et al., 2014). La SFTPA inhibe la progresión del cáncer de pulmón regulando la polarización de los macrófagos asociados al tumor (Mitsuhashi et al., 2013). La expresión de un mutante de SFTPA2 en células epiteliales del pulmón da lugar a la secreción de TGF-beta1 latente y a la transición epitelio-mesénquima mediada por TGF-beta1 (Maitra et al., 2012). Además, el desarrollo de cáncer de próstata puede estar relacionado con una reducción del nivel de SFTPA (Kankavi et al., 2014).

Familia de transportadores de solutos, número 25 (transportador mitocondrial; transportador de nucleótidos de adenina), miembro 31 (SLC25A31) / familia de transportadores de solutos, número 25 (transportador mitocondrial; transportador de nucleótidos de adenina), miembro 4 (SLC25A4) / familia de transportadores de solutos, número 25 (transportador mitocondrial; transportador de nucleótidos de adenina), miembro 5 (SLC25A5) / familia de transportadores de solutos, número 25 (transportador mitocondrial; transportador de nucleótidos de adenina), miembro 6 (SLC25A6) – Las proteínas de la familia de transportadores de solutos número 25 son transportadores de ADP/ATP que intercambian el ADP citosólico por ATP de la matriz mitocondrial. Funcionan como un poro de apertura regulada que transporta ADP/ATP y formar un homodímero empotrado en la membrana interna de las mitocondrias. Se ha demostrado que las células que sobreexpresan esta familia de genes presentan un fenotipo antiapoptósico. Se ha comprobado que la inhibición de la expresión de esta familia de genes induce la apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral. Mientras que la SLC25A4 se localiza preferentemente en los tejidos diferenciados y es específica del músculo y del cerebro, la SLC25A5 se expresa en los tejidos proliferantes tales como los tumores. La SLC25A6 se expresa de forma ubicua, y la SLC25A31 se localiza en las células hepáticas y reproductoras (Dolce et al., 2005). Especialmente la SLC25A5 contribuye a la oncogénesis. Dado que la expresión de SLC25A5 está estrechamente ligada a la dinámica bioenergética mitocondrial de los tumores, constituye una diana prometedora para los tratamientos individualizados del cáncer y para el desarrollo de estrategias contra el cáncer (Chevrollier et al., 2011). Además, la sobreexpresión estable de SLC25A31 protegía a las células cancerosas de la lonidamina y de la apoptosis por estaurosporina independiente de la expresión de Bcl-2. Por consiguiente, la subfamilia de isoformas de la SLC25 humana presenta una dicotomía,

de modo que las isoformas SLC25A4 y SLC25A6 funcionan como proapoptósicas, mientras que las isoformas SLC25A5 y SLC25A31 hacen a las células resistentes a los estímulos que provocan la muerte (Gallerne et al., 2010).

Proteína SP140 del cuerpo nuclear (SP140) – El gen SP140 codifica la proteína SP140 del cuerpo nuclear, que se localiza en el cromosoma 2q37.1. Se ha demostrado que la SP140 estaba regulada al alza en el carcinoma epidermoide de laringe (Zhou et al., 2007). La SP140 está relacionada con la leucemia linfocítica crónica (Lan et al., 2010), el mieloma múltiple (Kortum et al., 2015) y la leucemia promielocítica aguda (Bloch et al., 1996).

Proteína transductora de señales y activadora de la transcripción, número 1, de 91 kDa (STAT1) – La STAT1 se activa por la fosforilación de tirosina en respuesta a todos los interferones (Decker et al., 2002), y contribuye a la diferenciación de las células Th1 (Schulz et al., 2009). En el plano molecular, la STAT1 inhibe la proliferación de las células tumorales, tanto de ratón como humanas, tratadas con IFN-γ, a través de su capacidad de aumentar la expresión del inhibidor p21Cip1 de cinasas dependientes de ciclina, o de disminuir la expresión de c-myc (Ramana et al., 2000). La actividad antitumoral de STAT1 está corroborada por su capacidad de inhibir la angiogénesis y las metástasis tumorales en modelos con ratones (Huang et al., 2002). Se comprobó que el aumento de los niveles de ARNm de STAT1 era parte de una firma molecular relacionada en un mejor pronóstico del desenlace de las metástasis en el caso de pacientes con cáncer de mama negativo para el receptor de hormonas y triple negativo (Yau et al., 2010).

Proteína transmembranaria 43 (TMEM43) – Este gen codifica la proteína transmembranaria 43. Las alteraciones en este gen causan la displasia arritmogénica familiar del ventrículo derecho de tipo 5 (ARVD5), también conocida como cardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho de tipo 5 (ARVC5). La ARVD es un trastorno hereditario caracterizado por taquicardia ventricular, insuficiencia cardíaca, muerte súbita de origen cardíaco y sustitución de los cardiomiocitos por tejido fibroadiposo (Siragam et al., 2014). La TMEM43 puede tener un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la envoltura nuclear a través de la

organización de complejos de proteínas en la membrana nuclear interna (Bengtsson and Otto, 2008).

Topoisomerasa (ADN) II alfa de 170 kDa (TOP2A) / topoisomerasa (ADN) II beta de 180 kDa (TOP2B) – Los genes TOP2A y TOP2B codifican isoformas muy homólogas de una topoisomerasa del ADN, una enzima que controla y altera los estados topológicos del ADN durante la transcripción. Esta enzima nuclear está implicada en procesos como la condensación de cromosomas, la separación de las cromátidas y la relajación de la tensión debida a la torsión que tiene lugar durante la transcripción y la replicación del ADN. La TOP2A es esencial para la proliferación celular y se expresa profusamente en células con alto ritmo de crecimiento, mientras que la TOP2B no es esencial para el crecimiento, y se ha sido vinculada recientemente con neoplasias malignas secundarias relacionadas con el tratamiento (Toyoda et al., 2008). La TOP2A está sobreexpresada en varios tipos de cáncer (p. ej.: mesotelioma maligno de la pleura (Roe et al., 2010), tumor maligno de las vainas de nervios periféricos (Kresse et al., 2008), células de adenocarcinoma de pulmón (Kobayashi et al., 2004), cáncer de vejiga (Simon et al., 2003), glioblastomas (Van den Boom et al., 2003)). La TOP2B está implicada en la transcripción, replicación y recombinación del ADN, así como la mitosis, y junto con la TOP1 representa el segundo gen que se fusiona con NUP98 que pertenece a la familia de genes de la topoisomerasa (Nebral et al., 2005).

Triptasa alfa/beta 1 (TPSAB1) / triptasa beta 2 (TPSB2) – La triptasa alfa/beta 1 (TPSAB1) y la triptasa beta 2 (TPSB2) se expresan en los mastocitos junto con otras dos isoformas de triptasa. Las triptasas se han implicado como mediadores en la patogenia del asma y de otros trastornos alérgicos e inflamatorios. La triptasa secretada por mastocitos tiene propiedades proangiogénicas y contribuye a la vascularización de los tumores. La triptasa funciona activando el receptor activado por proteasas, número 2 (PAR-2) y contribuye, además, a la degradación de la matriz extracelular, por lo que también facilita el crecimiento de los vasos sanguíneos. Además, la presencia de mastocitos positivos para triptasas en el tejido tumoral correlaciona con la angiogénesis en varios tipos de cáncer (Ammendola et al., 2014). Se ha comunicado la presencia de niveles elevados de mastocitos positivos para triptasas en el cáncer de próstata y se han correlacionado con la densidad de microcapilares, el estadio del tumor, y una supervivencia más corta (Nonomura et al.,

2007; Stawerski et al., 2013). De forma similar, los mastocitos positivos para triptasas también están relacionados con el estadio del tumor y la angiogénesis en el cáncer gástrico (Zhao et al., 2012; Ribatti et al., 2010), así como en el adenocarcinoma de pulmón (Imada et al., 2000; Takanami et al., 2000).

Proteína con motivo tripartito, número 11 (TRIM11) – La proteína con motivo tripartito, número 11, está codificada en los seres humanos por el gen TRIM11. Se sabe que la TRIM11 participa en el desarrollo del sistema nervioso central y que desestabiliza la humanina, un inhibidor de las lesiones neuronales semejantes a las de la enfermedad de Alzheimer (Niikura et al., 2003). La TRIM11 está sobreexpresada en gliomas de alto grado y estimula la proliferación, la invasión, la migración y el crecimiento de los tumores de la glía (Di et al., 2013).

Canal catiónico de receptor con potencial transitorio, subfamilia M, miembro 2 (TRPM2) – La proteína codificada por este gen es un canal de cationes permeable al calcio, que está regulado por la ADP-ribosa libre intracelular. Es posible que el TRPM2 intervenga en la apoptosis en ciertas condiciones (Ishii et al., 2007; Cao et al., 2015). No obstante, no está tan claro su efecto en la proliferación y el crecimiento celular, y puede que dependa de las condiciones del cultivo celular y de la expresión de isoformas alternativas de corte y empalme (Chen et al., 2014). En el melanoma y en el cáncer de próstata se ha identificado un producto de transcripción antisentido del TRPM2 que abunda en el tumor y que se correlaciona con la apoptosis y con el desenlace clínico (Orfanelli et al., 2015).

Proteína asociada al complejo de la tubulina gamma, número 3 (TUBGCP3) – La proteína asociada al complejo de la tubulina gamma, número 3, es parte del complejo de la tubulina gamma de múltiples subunidades que tiene una importancia crítica para la nucleación de los microtúbulos en las células eucariotas (Lynch et al., 2014). Los complejos citoplásmicos de tubulina gamma son dirigidos a los centrosomas u otros centros organizadores de microtúbulos a través de un conjunto de componentes llamados proteínas de unión al complejo de la tubulina gamma. Se halló un aumento significativo de la expresión de productos de transcripción de TUBGCP3 en células de glioblastoma en comparación con los astrotrocitos humanos normales, y la inmunorreactividad del TUBGCP3 aparecía significativamente elevada en

comparación con la presente en los cerebros normales. La TUBGCP3 también estaba relacionada con la proliferación de la microvasculatura y la interacción con las rutas de transmisión de señales que dan lugar a un fenotipo maligno (Draberova et al., 2015). Además, se comprobó que la expresión de TUBGCP3 era significativamente más alta en muestras tetraploides de linfoma de células del manto que en las diploides (Neben et al., 2007).

Enzima modificadora/activadora similar a la ubiquitina, número 6 (UBA6) – La enzima modificadora/activadora similar a la ubiquitina, número 6 es una proteína que está codificada en los seres humanos por el gen UBA6. La UBA6 es una enzima activadora de la ubiquitina que se expresa de forma abundante sobre todo en los testículos. Además, es necesaria para la respuesta celular a los daños en el ADN (Moudry et al., 2012).

Receptor de retrovirus xenotrópicos y politrópicos, número 1 (XPR1) – El XPR1 es una molécula de membrana de múltiples pasos que contiene un dominio SPX aminoterminal de 180 residuos de longitud (la denominación procede de SYG1, Pho81 y XPR1). Se ha notificado que el XPR1 interviene en la exportación de fosfato (Giovannini et al., 2013). Tras la diferenciación de los osteoclastos se comprobó que los productos de transcripción de ARNm del XPR1 habían aumentado (Sharma et al., 2010). En un principio, el XPR1 se describió como un receptor de retrovirus utilizados por MLV xenotrópicos y politrópicos (X-MLV y P-MLV), dos retrovirus gamma que pueden infectar tanto células humanas como de otras especies, tales como ratones y aves (Kozak, 2010; Martin et al., 2013).

Proteína con dedos de zinc de tipo BED, número 5 (ZBED5) – El gen de la proteína con dedos de zinc de tipo BED, número 5, se caracteriza por una secuencia codificante que procede en su mayor parte del transposón de ADN similar a *Charlie*; no obstante, no parece ser un transposón de ADN activo ya que no está flanqueado por repeticiones terminales invertidas. El ZBED5 está relacionado con los transposones de ADN *Buster* y está separado filogenéticamente de otros ZBED. Los genes ZBED se expresan ampliamente en los tejidos de vertebrados y regulan conjuntamente una notable variedad de funciones (Hayward et al., 2013).

Proteína con dedos de zinc 697 (ZNF697) – El gen ZNF697 codifica la proteína con dedos de zinc 697, que se localiza en el cromosoma 1p12 y probablemente interviene en la unión al ADN (Yu et al., 2011).
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).

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

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

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12, 13 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 11: 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%

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
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%
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%

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
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 HLA-A*02 y HLA-A*24. Los péptidos de MHC de clase II de la invención se unen a varias moléculas HLA de clase II distintas y se denominan promiscuos (péptidos panunionistas). 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 o A*24 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 A*24 de la invención, 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 quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Utilizados en relación con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tal y como se ha dicho antes, la presente invención se refiere por tanto a un péptido que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º 24 o una variante de la misma que es un 88% homóloga a la SEQ ID N.º 24, 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 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 indicada en la SEQ ID N.º 24. 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 24, 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.

Tabla12: Variantes preferidas y motivos de los péptidos HLA-A*02 acordes con las SEQ ID N.º 1, 2 y 4.

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 1	K	L	L	P	Y	I	V	G	V
Variante									I
									L

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

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

Table 12B: Variantes preferidas y motivos de los péptidos HLA-A*02 acordes con las SEQ ID N.º 13

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID N.º 13	F	L	F	D	G	S	A	N	L
Variante									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V

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

Tabla 13: Variantes preferidas y motivos de los péptidos HLA-A*24 acordes con las SEQ ID N.º 23, 24 y 25

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID N.º 23	V	Y	T	S	W	Q	I	P	Q	K	F
Variante											I
											L
		F									I
		F									L
		F									
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID N.º 24	N	Y	P	K	S	I	H	S	F		
Variante									I		
									L		
		F							I		
		F							L		
		F									
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID N.º 25	R	F	M	D	G	H	I	T	F		
Variante		Y							I		
		Y							L		
		Y									
									I		
									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 14 se exponen combinaciones de las elongaciones conformes a la invención:

Tabla14: 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 una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 24.

«Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a la SEQ ID N.º 24 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 proteolisis.

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. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), que se incorpora en la presente memoria como referencia.La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido perfórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

En resumen, la modificación de p. ej., los residuos arginilo de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilglioxal, 2,3-

butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilglioxal con residuos de arginina. La cisteína se puede modificar sin la modificación simultánea de otros sitios nucleofílicos como sucede con la lisina y la histidina. Así pues, para la modificación de la cisteína hay disponible un gran número de reactivos. Las páginas web de empresas como Sigma-Aldrich (http://www.sigma-aldrich.com) ofrecen información sobre reactivos concretos.

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

Los residuos tirosilo se pueden modificar con tetranitrometano y N-acetilimidazol. La formación de enlaces cruzados por medio de la formación de ditirosina se puede 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. 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).

Para la identificación y la cuantificación relativa de los ligandos HLA mediante espectrometría de masas se purificaron moléculas HLA de muestras de tejido

criogenizadas y se aislaron los péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y se identificaron sus secuencias mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con ionización por nano-electronebulización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de fragmentación de los TUMAP naturales registrados a partir de muestras de cáncer de pulmón (amicrocítico) (N= 91 muestras positivas para A*02 y N=80 muestras positivas para A*24) con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica.Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación natural de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de 155 pacientes con cáncer de pulmón (amicrocítico).

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

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

Además, la plataforma para el descubrimiento de fármacos XPRESIDENT® v2.x permite la cuantificación absoluta directa de niveles de péptidos restringidos a MHC, y preferiblemente restringidos a HLA, en los tejidos cancerosos o en otros tejidos infectados. En resumen, el número total de células se calculó a partir del contenido de ADN total de la muestra de tejido analizada. La cantidad total de péptido de un TUMAP

en una muestra de tejido se midió con nanoCL-EM/EM como el cociente entre el TUMAP natural y una cantidad conocida de una versión del TUMAP marcada con isótopos, que constituye el llamado patrón interno. La eficacia del aislamiento de TUMAP se determinó mediante adiciones (*spiking*), a los complejos de péptido:MHC, de todos los TUMAP al lisado del tejido lo antes posible durante el procedimiento de aislamiento de TUMAP y su detección por nanoCL-EM/EM después de finalizar el procedimiento de aislamiento del péptido. El número total de células y la cantidad total de péptido se calcularon a partir de mediciones por triplicado de cada muestra de tejido. Se calcularon las eficacias del aislamiento específicas de péptido como promedio de 10 experimentos de adición, medido cada uno de ellos por triplicado (véanse los ejemplos y la Tabla 22).

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

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

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos de cáncer de pulmón (amicrocítico) 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.

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

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

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, por ejemplo células de cáncer de pulmón 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, específicamente fragmentos de unión de los mismos, ligandos similares a 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.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un método para producir un receptor de linfocitos 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, y su afinidad se puede aumentar por mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de la complementariedad. Para la selección de receptores de linfocitos T se puede utilizar un fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). A fin de estabilizar los receptores de linfocitos T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar, p. ej.: mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocitos T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). El receptor de linfocitos T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, p. ej.: US 2013/0115191), dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de realizar funciones específicas en las células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia adoptiva. Se puede encontrar más información en los documentos WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. En el documento WO 2012/056407A1 se describe una combinación de sTCR. Otros métodos de producción se describen en WO 2013/057586A1.

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

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

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

inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

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

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedaroras procariotas, véanse por ejemplo Cohen y cols. (Cohen et al., 1972) y (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman y cols.(Sherman et al., 1986).El método de Beggs(Beggs, 1978)también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células

de vertebrados, por ejemplo el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

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

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

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

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

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

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Una perspectiva general se puede consultar por ejemplo en Teufel y cols.(Teufel et al., 2005).Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la “pistola génica”, también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un 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, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmunitario (p. ej., anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, interferón-alfa, oligonucleótidos CpG y

derivados, poli-(I:C) y derivados, ARN, sildenafilo, y formulaciones de partículas con PLG o virosomas.

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

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

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

Es importante tener presente que la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna conforme a la invención ataca el cáncer en diferentes estadios celulares y en

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con la SEQ ID N.º 24, 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 24, o a una variante de la misma que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 24 o una variante de la misma que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, en que dicho péptido no es un polipéptido entero subyacente.

La presente invención se refiere, además, a un péptido que comprende una secuencia de la SEQ ID N.º 24 o a una variante de la misma que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a la SEQ ID N.º 24, 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 de la secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 24.

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

La presente invención se refiere, además, a los péptidos conformes a la presente invención, en que dichos péptidos son parte de una proteína de fusión, en particular comprenden aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno

HLA-DR (Ii), o en que el péptido está fusionado con (o en la secuencia de) un anticuerpo, como por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.

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

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

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

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

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 24, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

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

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

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

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

La presente invención concierne además al uso acorde con la presente invención, en que dichas células tumorales son células de cáncer de pulmóno células de otro tumor

sólido o hematológico como el cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer gástrico, melanoma, carcinoma de células de Merkel, leucemia (LMA, LLC), linfoma no hodgkiniano (LNH), cáncer de esófago incluido el cáncer de la unión gastroesofágica, cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma, cáncer de vejiga urinaria y cáncer de útero.

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

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

Si es posible los anticuerpos de la invención se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entiende que para fabricar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto polipéptidos marcadores enteros de cáncer de pulmón, 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 24, 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 delcáncer de pulmónutilizado 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 de pulmón congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.

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

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

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

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

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la biolongevidad, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al

dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagénesis dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

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

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios residuos de aminoácidos de origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son denominados residuos «importados», que normalmente se extraen del dominio variable «importado». La humanización se puede llevar a cabo básicamente sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedor por las secuencias

correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567), en los que una parte notablemente más pequeña que un dominio variable humano intacto ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

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

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

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

sanguíneo. Los anticuerpos también se pueden administrar por vía intratumoral o peritumoral para ejercer un efecto terapéutico a la par sistémico y local. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

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

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 mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy 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 dominios que recluten

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

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

Los anticuerpos o TCR también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína 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 las SEQ ID N.º 24, 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 24.

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

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

Los linfocitos T de la presente invención se pueden usar como principios activos de una composición terapéutica. Por tanto, la invención también proporciona un método para destruir células diana de un paciente que expresan de forma aberrante un

polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, comprendiendo dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los definidos arriba.

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

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

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

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

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

La presente invención también contempla un equipo que comprende:

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

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

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

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

Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituida es preferiblemente como mínimo de 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferiblemente como máximo de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El equipo puede incluir además otros materiales deseables desde el punto

de vista comercial y del usuario, tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Los equipos de la presente invención pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención, acompañado o no de otros componentes (p. ej., otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.

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

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

La presente formulación puede ser toda aquella que sea adecuada para la administración de los péptidos a través de cualquier vía aceptable como la oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o

transdérmica. Se prefiere la administración subcutánea y, con mayor preferencia, la intradérmica tal vez a través de una bomba de infusión.

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

La presente invención se refiere, además, a un método para producir 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 cáncer de pulmón que presentan varios alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C. Puede contener péptidos de MHC de clase I y de clase II o péptidos alargados de MHC de clase I. Además de los péptidos asociados a tumor obtenidos de varios tejidos de cáncer de pulmón, el archivo puede contener péptidos marcadores HLA-A*02 y HLA-A*24. Estos péptidos

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

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

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

linfocitos T humanos procedentes de donantes sanos y de pacientes con cáncer de pulmón.

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 por las células del cáncer de pulmón y se ha determinado que tales péptidos no están presentes o lo están en niveles bajos en los tejidos normales, pueden ser utilizados para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los péptidos reivindicados en las biopsias de tejido puede ayudar al histopatólogo a diagnosticar un cáncer. La detección de ciertos péptidos por medio de anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica puede advertir al histopatólogo de que la muestra es maligna o está inflamada o enferma en general, o puede ser utilizada como un biomarcador del cáncer de pulmón. 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, preferiblemente hace referencia a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 24, y usos de los mismos. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de amino ácidos de cualquiera de la SEQ ID No. 1 a la SEQ ID No. 23, la SEQ ID No. 25, de la SEQ ID No. 27 a la SEQ ID No. 29, de la SEQ ID No. 31, de la SEQ ID No. 32, de la SEQ ID No. 35 a SEQ ID No. 88, o de la SEQ ID No. 90 a SEQ ID No. 158, o de la SEQ ID No. 161 a la SEQ ID No. 177 como ejemplos de referencia. Los ejemplos siguientes

se proporcionan como sustento para el péptido que comprende la SEQ ID NO: 24, y usos de los mismos.

En las Figuras

La Figura 1A-D muestran la sobrepresentación de varios péptidos en tejidos normales y de cáncer de pulmón amicrocítico.La Figura 1E-F muestra todas las estirpes celulares, los tejidos normales y los tejidos cancerosos en que se han detectado los péptidos ilustrados a título de ejemplo (FVFSFPVSV, SEQ ID N.º 4 (A*02) y YYTKGFALLNF, SEQ ID N.º 29 (A*24)).

Figura 1A - Gen: SLC6A14, Péptido: FLIPYAIML (A*02; SEQ ID N.º 2) – Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 25 arterias, 3 médulas óseas, 8 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 1 duodeno, 7 esófagos, 2 vesículas biliares, 5 corazones, 16 riñones, 4 muestras de leucocitos, 21 hígados, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 hipósifis, 1 placenta, 3 pleuras, 6 rectos, 2 glándulas salivales, 3 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 1 uréter, 2 úteros, 2 venas, 46 pulmones, 91 cánceres de pulmón amicrocíticos. El péptido también se halló en cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer colorrectal y cáncer de esófago (no mostrados).Figura 1B - Gen: COL6A3, Péptido: FLFDGSANL (A*02; SEQ ID N.º 13) - Tejidos de izquierda a derecha: 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 5 arterias, 3 médulas óseas, 8 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 1 duodeno, 7 esófagos, 2 vesículas biliares, 5 corazones, 16 riñones, 4 muestras de leucocitos, 21 hígados, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 2 nervios periféricos, 1 peritoneo, 1 hipósifis, 1 placenta, 3 pleuras, 6 rectos, 2 glándulas salivales, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 2 intestinos delgados, 4 bazos, 7 estómagos, 3 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 1 uréter, 2 úteros, 2 venas, 46 pulmones, 91 cánceres de pulmón amicrocíticos. El péptido también se halló en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer hepático, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, y cáncer gástrico (no mostrados).

Figura 1C - Gen: CCL18, Péptido: VYTSWQIPQKF (A*24;SEQ ID N.º 23) - Tejidos de izquierda a derecha: 2 glándulas suprarrenales, 1 arteria, 4 cerebros, 1 mama, 5 colones, 1 corazón, 13 riñones, 9 hígados, 3 páncreas, 1 hipósifis, 2 rectos, 3 pieles, 1 bazo, 12 estómagos, 1 timo, 2 úteros, 9 pulmones, 80 cánceres de pulmón amicrocíticos. El péptido también se halló en cáncer de próstata y cáncer gástrico (no mostrados).

Figura 1D - Gen: CENPN, Péptido: RYLDSLKAIVF (A*24; SEQ ID N.º 28) - Tejidos de izquierda a derecha: 2 glándulas suprarrenales, 1 arteria, 4 cerebros, 1 mama, 5 colones, 1 corazón, 13 riñones, 9 hígados, 3 páncreas, 1 hipósifis, 2 rectos, 3 pieles, 1 bazo, 12 estómagos, 1 timo, 2 úteros, 9 pulmones y 80 cánceres de pulmón amicrocíticos. El péptido también se halló en cáncer hepático, cáncer gástricoy cáncer de células renales (no mostrados).

Figura 1E - Gen: DUSP4, Péptido: FVFSFPVSV (A*02; SEQ ID N.º 4) - Tejidos de izquierda a derecha: 5 estirpes de células pancreáticas, 3 pieles, 15 tejidos normales (2 esófagos, 7 pulmones, 3 bazos, 3 estómagos), 126 tejidos cancerosos (1 cáncer de cerebro, 2 cánceres de mama, 5 cánceres de colon, 5 cánceres de esófago,2 cánceres de vesícula biliar, 8 cánceres de riñón, 5 cánceres de hígado, 58 canceres de pulmón, 11 cánceres de ovario, 9 cánceres de páncreas, 2 cánceres de próstata, 1 cáncer de recto, 4 cánceres de piel y 12 cánceres de estómago y 1 cáncer de testículo). El conjunto de tejidos normales analizado fue el mismo que en A-B, pero no se muestran los tejidos donde no se detectó.

Figura 1F - Gen: PLOD2, Péptido: YYTKGFALLNF (A*24; SEQ ID N.º 29)
Tejidos de izquierda a derecha: 30 tejidos cancerosos (1 cáncer de cerebro, 3 cánceres de riñón, 2 cánceres de hígado, 22 cánceres de pulmón, 2 cánceres de estómago). El conjunto de tejidos normales analizado fue el mismo que en C-D, pero no se muestran los tejidos donde no se detectó.
La Figura 1G muestra la sobrepresentación de un péptido A*24 en tejidos normales y en muestras de cáncer de pulmón amicrocítico. Gen: LAMP3, Péptido: RFMDGHITF (A*24; SEQ ID N.º :25) – Tejidos de izquierda a derecha: 2 glándulas suprarrenales, 1 arteria, 4 cerebros, 1 mama, 5 colones, 1 corazón, 13 riñones, 9 hígados, 3 páncreas, 1 hipófisis, 2 rectos, 3 pieles, 1 bazo, 12 estómagos, 1 timo, 2 útero, 9 pulmones, 80 cánceres de pulmón amicrocíticos. El péptido también se detectó en muestras de cáncer de próstata y cáncer gástrico (no mostradas)

La Figura 2 muestra perfiles de expresión a modo de ejemplo (expresión relativa comparada con el riñón normal) de genes originarios de la presente invención que están fuertemente sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el cáncer de pulmón en comparación con un grupo de tejidos normales y en 38 muestras de

cáncer de pulmón. Tejidos de izquierda a derecha: Glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (entero), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena, 1 muestra de pulmón normal (sano), 38 muestras de cáncer de pulmón amicrocítico. A) SMC4, B) LAMB3, C) MMP12 y D) LAMP3

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. A) SLC1A4-001 (SEQ ID N.º 12), B) IGF2BP3-001 (SEQ ID N.º 120), C) LAMC2-001 (SEQ ID N.º 121), D) COL6A3-008 (SEQ ID N.º 13), y E) LAMP3-001 (SEQ ID N.º 25).

En la figura 4 se presentan los resultados de la proliferación, estimulada por antígenos, de linfocitos T $CD4^+$: La figura muestra el número de donantes positivos para cada péptido.

En la figura 5 se presentan ejemplos de la respuesta de linfocitos T positivos para CD4 inducida por vacunas contra CEA-006 en el ensayo de tinción intracelular (ICS) de moléculas de clase II. Tras la sensibilización *in vitro* se analizaron las PBMC del paciente 36-031 en busca de respuestas de linfocitos T positivos para CD4 contra CEA-006 (recuadro superior) y de reacción simulada (recuadro inferior) en el punto temporal V8/EOS. Las células se estimularon con los correspondientes péptidos y se tiñeron con pigmentos de viabilidad, anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 y marcadores de moléculas efectoras (de derecha a izquierda: CD154, TNF alfa, IFN gamma, IL-2, IL-10), respectivamente. Los linfocitos T positivos para CD4 viables se analizaron para comprobar la proporción de células positivas para una o más moléculas efectoras.

En la figura 6 se presentan los resultados de inmunogenicidad de los péptidos de clase II de control: el diagrama muestra la tasa de respuesta inmunitaria a 5 péptidos de clase II detectados en 16 pacientes en el caso de los péptidos IMA950, y en 71 pacientes en el caso de los péptidos IMA910 utilizando ICS.

EJEMPLOS

La presente invención, preferiblemente hace referencia a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 24, y usos de los mismos. Los ejemplos se refieren además a péptidos que comprenden las secuencias de amino ácidos de cualquiera de la SEQ ID No. 1 a la SEQ ID No. 23, la SEQ ID No. 25, de la SEQ ID No. 27 a la SEQ ID No. 29, de la SEQ ID No. 31, de la SEQ ID No. 32, de la SEQ ID No. 35 a SEQ ID No. 88, o de la SEQ ID No. 90 a SEQ ID No. 158, o de la SEQ ID No. 161 a la SEQ ID No. 177 como ejemplos de referencia. Los ejemplos siguientes se proporcionan como sustento para el péptido que comprende la SEQ ID NO: 24, y usos de los mismos.

EJEMPLO 1

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

Muestras de tejido

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

Los tejidos normales (sanos) se obtuvieron de Bio-Options Inc, California, EE.UU.; BioServe, Beltsville, Maryland, EE.UU.; Capital BioScience Inc, Rockville, Maryland, EE.UU.; Geneticist Inc., Glendale, California, EE.UU.; Hospital Universitario de Ginebra; Hospital Universitario de Heidelberg; Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto (KPUM); Universidad de la Ciudad de Osaka (OCU); Hospital Universitario de Múnich; ProteoGenex Inc., Culver City, California, EE.UU.; Hospital Universitario de Tubinga.

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

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

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

Análisis por espectrometría de masas

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

La cuantificación relativa de la CL-EM sin marcador se efectuó por recuento iónico, es decir por extracción y análisis de las características de CL-EM ((Mueller et al., 2007). El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron además con deconvolución del estado de carga y alineamiento del tiempo de retención (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Por último, todas las

características CL-EM se cotejaron con los resultados de la identificación de secuencias para combinar los datos cuantitativos de muestras y tejidos diferentes con los perfiles de presentación de péptidos. Los datos cuantitativos se normalizaron en proporción dos tercios de acuerdo con la tendencia central para tener en cuenta la variación entre los duplicados técnicos y biológicos. De ese modo, cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo, todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra así como las variaciones de los duplicados. Los perfiles superponen muestras de cáncer de pulmón 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 15 y la Tabla 16.

Tabla 15: Puntuaciones de presentación. La tabla enumera péptidos HLA-A*02 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 (+).

SEQ ID No.	Secuencia	Código del péptido	Presentación del péptido
1	KLLPYIVGV	COL6A3-010	+++
2	FLIPYAIML	SLC6A14-001	+++
3	FLYDVVKSL	COL6A3-007	++
4	FVFSFPVSV	DUSP4-001	+
5	ALTSTLISV	GPNM-002	++
9	ALSGTLSGV	MCM5-001	++
13	FLFDGSANL	COL6A3-008	+++
14	LIQDRVAEV	LAMB3-001	+
15	ELDRTPPEV	SF3B3-001	+
16	LIFDLGGGTFDV	HSP-003	+

17	TLLQEQGTKTV	KRT-006	+
18	ILLTEQINL	PHT-001	+
20	LMTKEISSV	PRKDC-001	+
21	VLSSGLTAA	CSNK2A2-001	+
94	ILVDWLVQV	CCNB2-001	+++
96	AMGIAPPKV	PRPF3-001	+
97	TLFPVRLLV	LPCAT1-001	+
98	VLYPHEPTAV	DONSON-001	++
99	ALFQRPPLI	DKC-001	+
101	LLLEILHEI	ERO-001	+
102	SLLSELQHA	GBP5-001	++
103	KLLSDPNYGV	TMEM43-001	+
105	IVAESLQQV	STA-002	+
111	SLYKGLLSV	RAD54B-001	+++
112	VLAPLFVYL	FZD-001	++
113	FLLDGSANV	COL6A3-002	+++
114	AMSSKFFLV	WNT5A-001	++
115	YVYQNNIYL	FAP-003	+
116	KIQEMQHFL	MMP12-003	+++
117	ILIDWLVQV	CCNB1-002	++
118	SLHFLILYV	ATP-001	+
119	IVDDITYNV	FN1-001	++
120	KIQEILTQV	IGF2BP3-001	+++
121	RLLDSVSRL	LAMC2-001	+
122	KLSWDLIYL	CERC-001	+
123	GLTDNIHLV	MXRA5-002	++
124	NLLDLDYEL	COL6A3-003	+++
125	RLDDLKMTV	LAMC2-002	++
126	KLLTEVHAA	ADAM8-001	++
127	ILFPDIIARA	MAGEF1-001	+
128	TLSSIKVEV	MXRA5-001	+++
129	GLIEIISNA	SNRNP20-001	+
130	KILEDVVGV	TPX2-001	+
131	ALVQDLAKA	CCNB1-001	+
132	ALFVRLLALA	TGFBI-001	++
133	RLASYLDKV	KRT-007	+

134	TLWYRAPEV	CDK4-001	+
136	ALVDHTPYL	VCAN-002	+
137	FLVDGSWSV	COL12A1-002	++
138	ALNEEAGRLLL	UBE2S-001	++
139	SLIEDLILL	SMYD3-001	++
142	VLLPVEVATHYL	SLC34A2-001	+
143	AIVDKVPSV	COPG1-001	+
144	KIFDEILVNA	TOP-001	+
145	AMTQLLAGV	TNC-001	+
146	FQYDHEAFL	RCN1-001	++
148	ALFGALFLA	PLT-001	+
149	KLVEFDFLGA	TACC3-001	+
150	GVLENIFGV	PCNXL3-001	+
152	ILQDRLNQV	CDC6-001	+
153	ALYDSVILL	DIO2-001	++
156	TVAEVIQSV	KIF26B-001	+

Tabla 16: Puntuaciones de presentación. La tabla enumera péptidos HLA-A*24 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(+).

SEQ ID No.	Secuencia	Código del péptido	Presentación del péptido
23	VYTSWQIPQKF	CCL18-001	+++
24	NYPKSIHSF	MMP12-005	+++
25	RFMDGHITF	LAMP3-001	+++
27	RYPPPVREF	COL6A3-012	+++
28	RYLDSLKAIVF	CENPN-001	+++
29	YYTKGFALLNF	PLOD2-002	+++
31	SYLDKVRAL	KRT-008	+++
32	EYQPEMLEKF	COL6A3-013	+++
35	TYNPEIYVI	ITGA2-002	+++
36	YYGNTLVEF	OLFML2B-001	+++
37	RYLEYFEKI	TTC13-001	+++
38	VFLNRAKAVFF	GPNM-003	+++
39	KFLEHTNFEF	DOCK2-001	+++

40	IYNPSMGVSVL	PVRL1-001	+++
41	TYIGQGYII	FKBP10-002	+++
42	VYVTIDENNIL	ABCC1-001	+++
43	RYTLHINTL	ALOX15B-001	+++
44	IYNQIAELW	SMPDL3B-001	+++
45	KFLESKGYEF	GFPT2-002	+++
46	NYTNGSFGSNF	DDX5-007	+++
47	RYISPDQLADL	ENO1-001	+++
48	YYYGNTLVEF	OLFML2B-002	+++
49	QYLFPSFETF	KLRD-001	+++
50	LYIGWDKHYGF	PSMA4-001	+++
51	NYLLESPHRF	PLE-001	+++
52	SYMEVPTYLNF	LAPTM5-001	+++
53	IYAGQWNDF	COLEC12-001	+++
54	AYKDKDISFF	ZBED5-001	+++
55	IYPVKYTQTF	PERP-001	+++
56	RYFPTQALNF	SLC-003	+++
57	SYSIGIANF	COL12A1-003	+++
58	VYFKPSLTPSGEF	NUP153-001	+++
59	HYFNTPFQL	PPTC-001	+++
60	SYPAKLSFI	FLJ44796-001	+++
61	RYGSPINTF	C6orf132-001	+++
62	AYKPGALTF	AIFM2-001	+++
63	LYINKANIW	G2E-002	+++
64	VYPLALYGF	XPR-001	+++
65	IYQRWKDLL	SAMD9L-001	+++
66	DYIPQLAKF	GLS-001	+++
67	IFLDYEAGHLSF	TRIM11-001	+++
68	RYLFVVDRL	MREG-001	+++
69	TYAALNSKATF	IQGAP1-001	+++
70	VYHSYLTIF	TRPM2-001	+++
71	TYLTNHLRL	ZNF697-001	+++
72	YYVDKLFNTI	RASA2-001	+++
73	RYLHVEGGNF	RBPJ-001	+++
74	EYLPEFLHTF	ABCA13-003	+++
75	AYPDLNEIYRSF	SP14-001	+++

76	VYTZIQSRF	DYR-001	+++
77	RYLEAGAAGLRW	HSPBP-001	+++
78	IYTRVTYYL	TPS-001	+++
79	RYGGSFAEL	KDM6B-001	++
81	KYIEAIQWI	DCSTA-001	+++
82	FYQGIVQQF	TUBGCP3-001	+++
83	EYSDVLAKLAF	AHD-001	+++
84	TFDVAPSRLDF	NOM-001	+++
85	PFLQASPHF	FAM83A-001	+++
161	LYQILQGIVF	CDC2-001	+++

EJEMPLO 2

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

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

Fuentes de ARN y preparación

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

El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Ámsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, California, EE.UU.). El ARN de varios

individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Experimentos con micromatrices

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes preprogramados en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos (*housekeeping*) suministrados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de señal dados por el software y la muestra normal de riñón se ajustó de forma arbitraria en 1,0.En la Figura 2 se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios de la presente invención que aparecen muy sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el cáncer de pulmón. La Tabla 17 y la Tabla 18 muestran las puntuaciones de expresión de otros genes mostrados a título de ejemplo.

Tabla 17: Puntuaciones de expresión. La tabla enumera péptidos HLA-A*02 derivados de genes que se sobreexpresan muchísimo más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+++), se sobreexpresan mucho más en los tumores que en el grupo

de tejidos normales (++), y se sobreexpresan más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+).

SEQ ID No.	Secuencia	Código del péptido	Expresión del gen
2	FLIPYAIML	SLC6A14-001	++
5	ALTSTLISV	GPNM-002	+
6	SLQGSIMTV	SFT-001	++
8	ALLNILSEV	UBA6-002	++
11	YLNVQVKEL	SMC4-002	++
12	IVDRTTTVV	SLC1A4-001	+
14	LIQDRVAEV	LAMB3-001	++
16	LIFDLGGGTFDV	HSP-003	+
18	ILLTEQINL	PHT-001	+
19	VLTSDSPAL	GPNM-001	+
95	KIIGIMEEV	MSH6-001	++
97	TLFPVRLLV	LPCAT1-001	+
105	IVAESLQQV	STA-002	++
106	SILEHQIQV	MCM4-001	++
108	TLLDFINAV	UBA6-001	++
115	YVYQNNIYL	FAP-003	+
116	KIQEMQHFL	MMP12-003	+++
117	ILIDWLVQV	CCNB1-002	+
119	IVDDITYNV	FN1-001	+
120	KIQEILTQV	IGF2BP3-001	++
121	RLLDSVSRL	LAMC2-001	++
125	RLDDLKMTV	LAMC2-002	++
130	KILEDVVGV	TPX2-001	+
131	ALVQDLAKA	CCNB1-001	+
133	RLASYLDKV	KRT-007	+
136	ALVDHTPYL	VCAN-002	+
140	TLYPHTSQV	VCAN-001	+
141	NLIEKSIYL	DST-001	+
142	VLLPVEVATHYL	SLC34A2-001	++
143	AIVDKVPSV	COPG1-001	+
144	KIFDEILVNA	TOP-001	++
152	ILQDRLNQV	CDC6-001	+
158	KLDETNNTL	DST-002	+

Table 18: Puntuaciones de expresión.La tabla enumera péptidos HLA-A*24 derivados de genes que se sobreexpresan muchísimo más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+++), se sobreexpresan mucho más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (++), y se sobreexpresan más en los tumores que en el grupo de tejidos normales (+).

SEQ ID No.	Secuencia	Código del péptido	Expresión del gen
23	VYTSWQIPQKF	CCL18-001	+++
24	NYPKSIHSF	MMP12-005	+++
25	RFMDGHITF	LAMP3-001	+++
28	RYLDSLKAIVF	CENPN-001	++
29	YYTKGFALLNF	PLOD2-002	+
31	SYLDKVRAL	KRT-008	+
35	TYNPEIYVI	ITGA2-002	+
38	VFLNRAKAVFF	GPNM-003	+
39	KFLEHTNFEF	DOCK2-001	+
43	RYTLHINTL	ALOX15B-001	+
47	RYISPDQLADL	ENO1-001	+
161	LYQILQGIVF	CDC2-001	+

EJEMPLO 3

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

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, los inventores llevaron a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de linfocitos T basado en estimulaciones reiteradas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo los inventores han podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 84 TUMAP restringidos a HLA-A*02 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 19).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para realizar las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígenos artificiales cargadas con el complejo péptido-MHC (pMHC) y el anticuerpo anti-CD28, los inventores aislaron primero los linfocitos T CD8+ de productos de leucoféresis frescos HLA-A*02 mediante la selección positiva con microperlas con CD8 (Miltenyi

Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) procedentes de donantes sanos obtenidas de la Clínica Universitaria de Mannheim, Alemania, tras obtener el consentimiento informado.

Los linfocitos CD8+ o PBMC aislados se incubaron hasta su utilización en medio para linfocitos T (TCM) consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml / 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 163) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID N.º 164), respectivamente.

Placas de 96 pocillos se tapizaron con 800.000 microperlas / 200 µl en presencia de 4 x 12,5 ng de diferentes pMHC biotinilados, se lavaron y después se les añadió 600 ng de anti-CD28 biotinilado en un volumen de 200 µl. Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1x106 linfocitos T CD8+ con $2x10^5$ microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 4 días

a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Para la lectura de los multímeros pMHC con 8 moléculas pMHC distintas por condición se empleó una estrategia de codificación combinatoria bidimensional según lo descrito en otro lugar (Andersen et al., 2012), con pequeñas modificaciones que comprenden el acoplamiento con 5 fluorocromos distintos. Por último, los análisis de los multímeros se llevaron a cabo tiñendo las células con el colorante vital Live/dead® del IR cercano (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con anticuerpo anti-CD8-FITC clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) y multímeros pMHC fluorescentes. Para el análisis se equipó un citómetro BD LSRII SORP con los filtros y láseres adecuados. Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis multimérico se efectuó con el software FlowJo (Tree Star, Oregón, EE. UU.). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ multímero+ específicos se detectó comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación in vitro (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de multímero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos del cáncer de pulmón

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 3 péptidos de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 84 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA A*02 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	Código del péptido	Pocillos	Donantes
1	COL6A3-010	++	++++

Seq ID	Código del péptido	Pocillos	Donantes
2	SLC6A14-001	+	++++
3	COL6A3-007	+	++++
4	DUSP4-001	++	++++
5	GPNM-002	+	++++
6	SFT-001	++	++++
7	KRT80-001	+	++
8	UBA6-002	++	++++
9	MCM5-001	+	++++
10	KRT15-001	++++	++++
11	SMC4-002	+	++++
12	SLC1A4-001	++++	++++
13	COL6A3-008	+	++
14	LAMB3-001	+	++++
15	SF3B3-001	++	++++
16	HSP-003	+	+++
17	KRT-006	+	++
18	PHT-001	+	++
19	GPNM-001	+	++++
21	CSNK2A2-001	+	+
22	PTPN13-001	+	+
94	CCNB2-001	++	++++
95	MSH6-001	++++	++++
96	PRPF3-001	++++	++++
97	LPCAT1-001	+++	++++
98	DONSON-001	+	++++
99	DKC-001	++	++++
100	BUB1B-001	++	++++
101	ERO-001	+	+++
102	GBP5-001	+	++
103	TMEM43-001	+	++++
104	COG4-001	+	++++
105	STA-002	+	+
106	MCM4-001	+	+
107	PSMD14-002	+	+++
108	UBA6-001	+	+++

Seq ID	Código del péptido	Pocillos	Donantes
109	CCZ-001	+	+++
111	RAD54B-001	++	++++
112	FZD-001	+++	++++
113	COL6A3-002	++	++++
114	WNT5A-001	++	++++
115	FAP-003	+	++++
116	MMP12-003	+	++++
117	CCNB1-002	++	++++
118	ATP-001	++++	++++
119	FN1-001	++	++++
120	IGF2BP3-001	+	++++
121	LAMC2-001	++	++++
122	CERC-001	+++	++++
123	MXRA5-002	+	++++
124	COL6A3-003	+	++++
125	LAMC2-002	+	++++
126	ADAM8-001	+	++++
127	MAGEF1-001	+++	++++
128	MXRA5-001	+	++++
129	SNRNP20-001	++	++++
130	TPX2-001	++	++++
131	CCNB1-001	++	++++
132	TGFBI-001	++	++++
133	KRT-007	++	++++
134	CDK4-001	++++	++++
135	GFPT2-001	+++	++++
136	VCAN-002	+	++++
137	COL12A1-002	+	++
138	UBE2S-001	+	++++
139	SMYD3-001	+	++
140	VCAN-001	++	++++
141	DST-001	+	++++
142	SLC34A2-001	+	++
143	COPG1-001	+	+++
144	TOP-001	+	++

Seq ID	Código del péptido	Pocillos	Donantes
145	TNC-001	+	++
147	BNC1-001	+	++++
148	PLT-001	+	++
149	TACC3-001	+	+++
150	PCNXL3-001	+	+++
151	DROSHA-001	+	++++
152	CDC6-001	+	+++
153	DIO2-001	+	+
154	ABCA13-001	+	++++
155	ABCA13-002	+	+++
156	KIF26B-001	+	+
157	SERPINB3-001	+	+++
158	DST-002	+	++

Tabla 20: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA A*24 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	Código del péptido	Pocillos	Donantes
23	CCL18-001	+	+
25	LAMP3-001	+	++
27	COL6A3-012	++	++++
28	CENPN-001	+	++++
29	PLOD2-002	+	+++
32	COL6A3-013	+	+
35	ITGA2-002	++	++++
36	OLFML2B-001	++	++++
37	TTC13-001	+++	++++
39	DOCK2-001	+	++
40	PVRL1-001	+	++
41	FKBP10-002	+	++++
42	ABCC1-001	+	++
43	ALOX15B-001	+	++
44	SMPDL3B-001	++	++++
46	DDX5-007	+	+

Seq ID	Código del péptido	Pocillos	Donantes
47	ENO1-001	+	+++
48	OLFML2B-002	+	++
49	KLRD-001	+	++++
50	PSMA4-001	+	++++
52	LAPTM5-001	+	++
53	COLEC12-001	+	+++
54	ZBED5-001	+	++++
56	SLC-003	+	+
57	COL12A1-003	+	++++
58	NUP153-001	+	+
59	PPTC-001	++	++++
61	C6orf132-001	+	+++
62	AIFM2-001	+	++
63	G2E-002	+	++
64	XPR-001	++	++++
65	SAMD9L-001	+	+++
66	GLS-001	+	++++
67	TRIM11-001	+	+
68	MREG-001	++++	++++
69	IQGAP1-001	+	+
70	TRPM2-001	++	++++
71	ZNF697-001	++	++++
72	RASA2-001	+	++
73	RBPJ-001	+	++
74	ABCA13-003	+	++
75	SP14-001	+	+
76	DYR-001	+	++
77	HSPBP-001	+	+
78	TPS-001	++	++++
79	KDM6B-001	+	++
81	DCSTA-001	++	++++
82	TUBGCP3-001	+	++
83	AHD-001	+	+++
85	FAM83A-001	++	++++
161	CDC2-001	+	++++

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 trifluorocetato) con una pureza superior al 85%. Todos los TUMAP se administraron preferiblemente como sales de trifluoroacetato o de acetato, aunque también es factible con otros tipos de sales farmacéuticamente aceptables.

EJEMPLO 5

Ensayos de unión a MHC

Los péptidos candidatos para las terapias basadas en linfocitos T según la presente invención fueron analizados de forma adicional para comprobar su capacidad de unión (afinidad) a MHC. Los complejos de péptidos individuales-MHC se produjeron mediante intercambio de UV-ligando, una técnica en la que un péptido sensible a la luz UV se escinde tras la irradiación con luz UV, y se intercambia con el péptido de interés según el análisis. Solo los péptidos candidatos que se pueden unir y estabilizar de forma eficaz a las moléculas de MHC sensibles al péptido son capaces de impedir la disociación de los complejos de MHC. Para determinar el rendimiento de la relación de intercambio se realizó una prueba de ELISA basada en la detección de la cadena ligera (β2m) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo como se describe de forma general en Rodenko y cols. (Rodenko et al., 2006).

Se recubrieron placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) durante toda la noche con 2 µg/ml de estreptavidina en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4x y se bloquearon durante 1 h a 37 °C en tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Los monómeros de HLA-A*02:01/MLA-001 replegados servían como patrones, y cubrían un intervalo de 15-500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC de la reacción de intercambio con luz UV se diluyeron 100 veces en tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con 2 µg/ml

de anticuerpo anti-β2m conjugado con HRP durante 1 h a 37 °C, se lavaron otra vez y se detectaron con solución de TMB, y la reacción se detuvo con NH_2SO_4. Se midió la absorción a 450 nm. Los péptidos candidatos que muestran un elevado rendimiento de intercambio (preferiblemente superior al 50%, y lo más preferiblemente superior al 75%) son generalmente preferidos para la generación y producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o receptores de linfocitos T o fragmentos de los mismos, ya que presentan suficiente afinidad por las moléculas de MHC e impiden la disociación de los complejos de MHC.

Tabla 21: Puntuaciones de unión a MHC de clase I
<20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 75%= +++; >= 75% = ++++

ID de la sec.	Código del péptido	Intercambio del péptido
31	KRT-008	+++
45	GFPT2-002	+++
51	PLE-001	+++
55	PERP-001	+++
60	FLJ44796-001	+++
80	FXR1-001	+++

EJEMPLO 6

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

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

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

Para llevar a cabo una cuantificación precisa de los péptidos por espectrometría de masas se generó una curva de calibración para cada péptido utilizando el método con patrón interno. El patrón interno es una variante, marcada con dos isótopos, de cada péptido, es decir: se incluyeron dos aminoácidos marcados con isótopos en la síntesis de los TUMAP. La diferencia con el péptido asociado al tumor reside solo en su masa, sin que haya diferencias en otras propiedades fisicoquímicas (Anderson et al., 2012). Se hicieron adiciones del patrón interno a cada muestra de EM y todas las señales de EM se normalizaron para tener en cuenta la señal de EM del patrón interno y contrarrestar posibles variaciones técnicas entre los experimentos de EM. Las curvas de calibración se prepararon en un mínimo de tres matrices distintas, a saber: las muestras eluidas de HLA-péptido procedentes de muestras naturales similares a las muestras habituales de EM, y cada preparación se midió en tandas duplicadas de EM. Para la evaluación, se normalizaron las señales de EM para tener en cuenta la señal del patrón interno, y se calculó una curva de calibración mediante regresión logística. Para la cuantificación de los péptidos asociados a tumores procedentes de las muestras de tejido, las muestras respectivas recibieron también adiciones del patrón interno, se normalizaron las señales de EM para tener en cuenta el patrón interno y se cuantificaron utilizando la curva de calibración del péptido.

Eficacia del aislamiento de péptido/MHC

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

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

Determinación del recuento de células en tejido sólido congelado

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

Copias del péptido por célula

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

eficacia del aislamiento. En la Tabla 22 se muestran los números de copias por célula correspondientes a péptidos seleccionados.

Tabla 22: Números absolutos de copias. En la tabla se enumeran los resultados de la cuantificación absoluta de los péptidos en las muestras tumorales de NSCLC. Las medianas de los números de copias por célula se indican para cada péptido: <100 = +; >=100 = ++; >=1000 +++; >=10 000 = ++++. Se indican los números de muestras para las que se disponía de datos evaluables de EM de alta calidad.

SEC. ID N.º	Código del péptido	Copias por célula (mediana)	Número de muestras
13	COL6A3-008	+++	18
23	CCL18-001	+++	19
24	MMP12-005	+++	11
25	LAMP3-001	++++	7
27	COL6A3-012	+++	12
29	PLOD2-002	++	22
32	COL6A3-013	++	20
35	ITGA2-002	++	19
36	OLFML2B-001	+++	22
37	TTC13-001	+++	13
38	GPNM-003	+++	5
41	FKBP10-002	++	19
98	DONSON-001	+	18
100	BUB1B-001	+	11
111	RAD54B-001	+	16
113	COL6A3-002	++	19
114	WNT5A-001	++	17
115	FAP-003	++	17
120	IGF2BP3-001	++	14
121	LAMC2-001	++	10
123	MXRA5-002	+	17
124	COL6A3-003	+++	18
126	ADAM8-001	+	15
128	MXRA5-001	++	19

137	COL12A1-002	++	12
140	VCAN-001	+	19
141	DST-001	++	12
147	BNC1-001	+	10
158	DST-002	++	7
161	CDC2-001	+++	18

EJEMPLO 6

Ensayos de proliferación de linfocitos T con HLA de clase II

En los experimentos siguientes se resumen los resultados de los ensayos de proliferación de linfocitos T con algunos TUMAP de MHC de clase II. Nueve de 10 antígenos peptídicos analizados dieron resultados positivos en las pruebas de inmunogenicidad. Once de 21 muestras evaluables de linfocitos T presentaron una respuesta positiva como mínimo frente a un péptido. Los antígenos peptídicos individuales estimularon la proliferación de linfocitos T CD4+ en un máximo de 6 donantes. Estos números son comparables a los resultados de cinco péptidos de referencia analizados en las mismas tandas de ensayos, y con la inmunogenicidad demostrada por la mayoría de los pacientes en el contexto de ensayos clínicos con vacunas. Por consiguiente, cabe concluir que los péptidos recientemente analizados tienen también muchas posibilidades de inducir respuestas de linfocitos T en ensayos con vacunas.

Con el fin de caracterizar el potencial de los péptidos seleccionados especialmente como candidatos a vacunas, se determinó su inmunogenicidad *in vitro* analizando la proliferación de linfocitos T mediante un ensayo comercial de proliferación de linfocitos T de la empresa ProImmune.

Con los péptidos seleccionados se analizaron muestras de células sanguíneas despojadas de CD8 procedentes de donantes sanos. Los péptidos que inducen la proliferación de linfocitos T $CD4^+$ podrían dar lugar al desarrollo de una respuesta inmunitaria de linfocitos T colaboradores, por lo que se consideran inmunógenos. La proliferación de linfocitos T $CD4^+$ se determinó utilizando marcado con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). En las células proliferantes el CFSE se distribuye de forma uniforme en las células que se dividen. Así, la proliferación puede medirse como un descenso de la fluorescencia del CFSE en las células analizadas.

Tabla 23 Péptidos seleccionados de HLA de clase II.

SEC. ID N.º:	ID del péptido	Secuencia	Origen
86	MMP12-007	LSADDIRGIQSLYGDPK	Presente solicitud
87	COL11A1-001	EGDIQQFLITGDPKAAYDY	Presente solicitud
92	COL1A2-001	NKPSRLPFLDIAPLDIGGAD	Presente solicitud
91	COL5A2-001	VARLPIIDLAPVDVGGTD	Presente solicitud
93	FN1-002	SRPQAPITGYRIVYSPSV	Presente solicitud
88	ITGB6-001	NPVSQVEILKNKPLSVG	Presente solicitud
90	LAMC2-003	DAVQMVITEAQKVDTR	Presente solicitud
110	LAMP3-002	IQLIVQDKESVFSPR	Presente solicitud
162	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	Presente solicitud
165	BIR-002	TLGEFLKLDRERAKN	Control positivo
166	MET-005	TFSYVDPVITSISPKYG	Control positivo
167	MMP-001	SQDDIKGIQKLYGKRS	Control positivo
168	CEA-006	SPQYSWRINGIPQQHT	Control positivo
169	TGFBI-004	TPPIDAHTRNLLRNH	Control positivo

Principio de la prueba

Se seleccionaron muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes humanos sanos procedentes del banco de células de ProImmune atendiendo a la expresión de alelos de HLA-DRB1. Se desalojaron los linfocitos T $CD8^+$ de las muestras de sangre de los donantes antes de su utilización, para evitar respuestas positivas falsas. El resto de los linfocitos T $CD4^+$ se marcaron con CFSE y se incubaron posteriormente con 5 µM de cada péptido seleccionado. Cada péptido se analizó en pocillos por sextuplicado. El valor de fondo se midió en cada placa utilizando seis pocillos de control no estimulados.

Tras un periodo de incubación de 7 días, las células se sometieron a tinción conjunta con anticuerpo anti-CD4 y se analizaron por citometría de flujo. El grado de proliferación se determinó midiendo la reducción de la intensidad del CFSE.

La evaluación de los datos de citometría de flujo se llevó a cabo utilizando el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc.). Los resultados del análisis por citometría de flujo se expresaron como el cociente de la población con atenuación de $CD4^+$ respecto a la población de $CD4^+$ total. El grado de proliferación se expresó en forma de porcentaje de estimulación por encima del valor de fondo, es decir: la proporción de células $CD4^+$, estimuladas con antígeno, con fluorescencia de CFSE atenuada menos la proporción de células $CD4^+$ con fluorescencia de CFSE atenuada en los pocillos de control no estimulados. Para cada muestra se calculó una media junto con el correspondiente error estándar de la media (SEM) de valores por sextuplicado.

Selección de los donantes

Los donantes se escogieron atendiendo a la expresión de alelos de HLA-DRB1. Los otros dos locus de HLA de clase II (DQ y DP) no se incluyeron en el análisis. Los alelos de DRB1 interesantes se seleccionaron con arreglo a las frecuencias de predicción de la unión al péptido según el algoritmo SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999). En el caso del HLA-DR, la unión se definió con una puntuación de predicción de la unión según SYFPEITHI igual o superior a 18. Este umbral de puntuación de la unión se definió sobre la base del análisis de las puntuaciones de la unión de ligandos promiscuos de HLA-DR conocidos y publicados (Tabla 24).

Tabla 24: Puntuaciones predichas según SYFPEITHI para la unión a HLA-DR de péptidos que han demostrado de forma experimental su unión a varios alelos de HLA-DR. Solo se muestran las puntuaciones predichas si la unión del alelo de DR indicado había sido demostrada de forma experimental. Si no se cuenta con información de alta resolución relativa a los alelos de DR, la puntuación se marca con un signo *. Veintitrés de 26 (89%) puntuaciones según SYFPEITHI son >=18, si se demostró la unión experimental en el caso de un alelo.

Péptido	**Alelo de DRB1***					
	0101	**0301**	**0401**	**0701**	**1101**	**1501**
SSX2$_{45-59}$ KIFYVYMKRKYEAMT SEC. ID N.º: 170	**-**	**-**	**-**	**18**	**24**	**-**
MAGE A3$_{111-125}$ RKVAELVHFLLLKYR SEC. ID N.º: 171	**24***	**-**	**26***	**-**	**23***	**-**
MAGE A3$_{146-160}$ FFPVIFSKASSSLQL SEC. ID N.º: 172	**31***	**-**	**28***	**24***	**24***	**-**
MAGE A3$_{191-205}$ GDNQIMPKAGLLIIV SEC. ID N.º: 173	**24***	**-**	**20***	**-**	**14***	**-**
MAGE A3$_{281-395}$ TSYVKVLHHMVKISG SEC. ID N.º: 174	**27***	**-**	**28***	**-**	**28***	**-**
NY-ESO-1$_{121-138}$ VLLKEFTVSGNILTIRLT SEC. ID N.º: 175	**22**	**-**	**-**	**24**	**14**	**-**
HER2/neu$_{883-899}$ KVPIKWMALESILRRRF SEC. ID N.º: 176	**25**	**-**	**22**	**-**	**-**	**-**
PADRE [D-Ala]K[L-ciclohexil-Ala] VAAWTLKAA[D-Ala] SEC. ID N.º: 177	**26**	**11**	**28**	**28**	**17**	**24**

Se solicitó la inclusión en el panel de donantes por parte de ProImmune de todos los alelos de DRB1 con frecuencia de unión superior al 20% en comparación con todos los péptidos seleccionados. Además, también se solicitó la inclusión de otros 4 alelos raros de DRB1 (DRB1*10:01, DRB1*16:01, DRB1*08:01 y DRB1*13:03). El conjunto de donantes escogidos se muestra en la Tabla 26.

Tabla 25 Capacidad de unión de péptidos seleccionados a varios alelos de HLA-DRB1 con motivo de unión conocido: Una puntuación de SYFPEITHI mayor de 17 se contabilizó con 1 episodio de unión. La última columna muestra el porcentaje de episodios de unión en todos los péptidos seleccionados.

MHC	MMP12-007	COL11A1-001	COL1A2-001	COL5A2-001	FN1-002	ITGB6-001	LAMC2-003	LAMP3-002	IGF2BP3-002	POSTN-002	BIR-002	MET-005	MMP-001	CEA-006	TGFBI-004	% de unión a péptidos
DRB1*0401	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
DRB1*0404	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
DRB1*0101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	93%
DRB1*0301	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	93%
DRB1*1104	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	93%
DRB1*0405	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	93%
DRB1*0402	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	87%
DRB1*0701	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	80%
DRB1*1501	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	73%
DRB1*1301	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	67%
DRB1*1502	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	67%
DRB1*1101	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	53%
DRB1*0901	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	40%
DRB1*1302	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	20%
DRB1*0802	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	20%
DRB1*0803	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	13%

Tabla 26 Conjunto de donantes. Distribución de alelos de HLA-DRB1 de 21 donantes seleccionados

ID del donante	DRB1_1	DRB1_2
D778	*04:04	*10:01
D780	*01:01	*04:01
D789	*13:01	*16:01
D799	*03:01	*09:01
D800	*15:02	*16:01
D801	*11:01	*15:01
D813	*07:01	*15:01
D816	*01:01	*04:05
D817	*10:01	*13:01
D820	*01:01	*07:01
D822	*04:04	*08:01
D829	*07:01	*11:01
D836	*13:01	*13:03
D845	*03:01	*11:04
D857	*03:01	*04:05
D906	*15:01	*15:02
D940	*04:01	*15:01
D946	*11:01	*14:01
D951	*03:01	*04:04
D962	*03:01	*09:01
D973	*03:01	*11:04

Resultados de inmunogenicidad *in vitro*

La proliferación, estimulada por antígenos, de linfocitos T $CD4^+$ se consideró un indicador de la inmunogenicidad *in vitro* y se investigó con un ensayo comercial de proliferación de linfocitos T de la empresa ProImmune. El grado de proliferación, estimulada por

antígenos, de linfocitos T $CD4^+$ se expresó como porcentaje de estimulación por encima del valor de fondo. Una respuesta de estimulación superior al 0,02% por encima del fondo con un SEM = 2 (es decir: valores superiores al fondo en dos errores estándar) se consideró positiva.

Nueve de los 10 antígenos peptídicos seleccionados (con la excepción del FN1-002) resultaron positivos en la prueba. Once de las 21 muestras evaluables de linfocitos T presentaron una respuesta positiva como mínimo en el caso de un péptido (Figura 4). Los antígenos peptídicos individuales estimularon la proliferación de linfocitos T $CD4^+$ en un máximo de 6 donantes.

Comparación de la inmunogenicidad *in vivo* e *in vitro*

El análisis de la proliferación de linfocitos T incluía como controles positivos 5 péptidos con inmunogenicidad *in vivo* conocida. La inmunogenicidad *in vivo* de estos péptidos se determinó en muestras de sangre de pacientes vacunados con estos péptidos en ensayos clínicos utilizando tinción intracelular de citocinas (ICS) de linfocitos T CD4.

En principio, los ensayos de ICS analizan la calidad de los linfocitos T específicos en lo referente a las funciones efectoras. Por tanto, las células mononucleares periféricas (PBMC) fueron estimuladas de nuevo *in vitro* con el péptido de interés, con un péptido de referencia y con un control negativo (llamado aquí MOCK). Después de la reestimulación las células se tiñeron para detectar la producción de IFN gamma, TNF alfa, IL-2 e IL-10, así como la expresión de la molécula coestimuladora CD154. El recuento de células teñidas se llevó a cabo con un citómetro de flujo (Figura 5).

El análisis de la inmunogenicidad demostró una respuesta inmunitaria del 100% con la vacunación con péptidos IMA950 (BIR-002 y MET-005) en 16 pacientes (estudio IMA950-101) y una respuesta inmunitaria entre el 44% y el 86% con la vacunación con péptidos IMA910 (CEA-006, TGFBI-004 y MMP-001) en 71 pacientes (estudio IMA910-101) (Figura 6).

Los resultados de la inmunogenicidad *in vitro* de péptidos con inmunogenicidad *in vivo* conocida se compararon con los de los péptidos seleccionados (Tabla 27). El análisis demostró que los péptidos de control positivo estimularon una proliferación de linfocitos T $CD4^+$ en 7 de 21 muestras de donantes investigadas. La potencia de la respuesta de estimulación se situaba como promedio del 0,09 al 0,31% por encima del fondo en un máximo de 4 muestras de donante por péptido. Por ejemplo, la potencia de estimulación en el caso del BIR-002 fue 0,24%. Se comprobó que el BIR-002 era muy inmunógeno en distintos ensayos clínicos. El BIR-002 se analizó como un componente de la vacuna peptídica específica del cáncer en un ensayo clínico con 19 pacientes evaluables que expresaban distintos alelos de HLA-DR (Feyerabend et al., 2009). Dieciséis (84%) pacientes desarrollaron una respuesta vigorosa de linfocitos T CD4+ contra el BIR-002 (Widenmeyer et al., 2008), lo que demuestra su elevada capacidad inmunógena. En el ensayo IMA950, el 100% (n=16) de los pacientes demostró una respuesta inmunitaria contra el BIR-002.

En comparación, a excepción del FN1-002, los péptidos seleccionados para el análisis actual estimularon la proliferación de linfocitos T $CD4^+$ en un total de 11 muestras de donantes investigadas. De este modo, la potencia de la respuesta de estimulación se situaba como promedio entre el 0,19 y el 0,48% por encima del fondo en un máximo de 6 donantes por péptido. Estos valores eran similares a los de la potencia de la respuesta de estimulación del péptido BIR-002, que era muy inmunógeno. Es interesante señalar que en el caso de todos los péptidos de control positivo la fracción de muestras de donantes positivas en el análisis de inmunogenicidad *in vitro* (intervalo: 4-19%) fue considerablemente menor que la fracción de pacientes que desarrollaron una respuesta inmunitaria contra estos péptidos en ensayos clínicos (intervalo: 44-100%). Esta observación indica que la configuración del ensayo actual de inmunogenicidad *in vitro* es bastante conservadora, y probablemente subestima la inmunogenicidad de los péptidos en el entorno clínico. Por tanto, cabe esperar que 9 de los 10 péptidos investigados provoquen muy probablemente una respuesta inmunitaria *in vivo* en ensayos clínicos en la mayoría de los pacientes.

Tabla 27. Resultados del ensayo de proliferación de linfocitos T con péptidos seleccionados y con péptidos de control positivo con valores conocidos de inmunogenicidad *in vivo*.

SEC. ID N.º	**ID del péptido**	**Número de donantes positivos**	**Potencia de la respuesta: media en % por encima del fondo**
86	MMP12-007	2	0,28
87	COL11A1-001	5	0,19
92	COL1A2-001	2	0,48
91	COL5A2-001	2	0,21
88	ITGB6-001	6	0,23
90	LAMC2-003	3	0,27
110	LAMP3-002	5	0,25
162	POSTN-002	2	0,39
165	BIR-002	3	0,24
166	MET-005	4	0,31
167	MMP-001	2	0,09
168	CEA-006	1	0,20
169	TGFBI-004	2	0,19

Lista de referencias bibliográficas

Aaltonen, K. et al., Br.J Cancer **100** (2009): 1055-1060

Abdelzaher, E. et al., Tumour.Biol. (2015)

Acuff, H. B. et al., Cancer Research **66** (2006): 7968-7975

Adhikary, G. et al., PLoS.ONE. **8** (2013): e84324

Agarwal, R. et al., Clinical Cancer Research **15** (2009): 3654-3662

Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124

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

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

Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res **11** (2012): 1868-1878

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

Asteriti, I. A. et al., Biochim.Biophys.Acta **1806** (2010): 230-239

Badiglian, Filho L. et al., Oncol Rep. **21** (2009): 313-320

Bae, J. S. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **294** (2002): 940-948

Bafna, S. et al., Oncogene **29** (2010): 2893-2904

Banchereau, J. et al., Cancer Res. **61** (2001): 6451-6458

Bargo, S. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **400** (2010): 606-612

Bartsch, S. et al., J Neurosci. **12** (1992): 736-749

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

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

Begnami, M. D. et al., Hum.Pathol. **41** (2010): 1120-1127

Beljan, Perak R. et al., Diagn.Pathol. **7** (2012): 165

Benaglio, P. et al., Hum.Mutat. **32** (2011): E2246-E2258

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

Bergner, A. et al., J Exp.Clin Cancer Res. **28** (2009): 25

Berndt, A. et al., Histochem.Cell Biol. **133** (2010): 467-475

Berthon, P. et al., Am.J Hum.Genet. **62** (1998): 1416-1424

Bird, A. W. et al., J Cell Biol. **182** (2008): 289-300

Blanco, M. A. et al., Cell Res **22** (2012): 1339-1355

Blatch, G. L. et al., BioEssays **21** (1999): 932-939

Bossard, C. et al., Int.J Cancer **131** (2012): 855-863

Bostrom, P. et al., BMC.Cancer **11** (2011): 348

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

Bragulla, H. H. et al., J Anat. **214** (2009): 516-559

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

Byrne, A. et al., Exp.Cell Res **316** (2010): 258-271

Calabrese, F. et al., Pathology **44** (2012): 192-198

Cao, Y. et al., Cancer Lett. (2015)

Capello, M. et al., FEBS J **278** (2011): 1064-1074

Cappello, P. et al., Int J Cancer **125** (2009): 639-648

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

Carroll, C. W. et al., Nat Cell Biol. **11** (2009): 896-902

Cataldo, D. D. et al., Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand) **49** (2003): 875-884

Cedres, S. et al., Clin Lung Cancer **12** (2011): 172-179

Cervantes, M. D. et al., Mol.Cell Biol. **26** (2006): 4690-4700

Chakraborti, S. et al., Mol.Cell Biochem. **253** (2003): 269-285

Chami, M. et al., Oncogene **19** (2000): 2877-2886

Chandler, S. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **228** (1996): 421-429

Chang, G. C. et al., Clinical Cancer Research **12** (2006): 5746-5754

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

Chen, D. R. et al., Anticancer Res. **30** (2010): 4135-4140

Chen, G. et al., Biomed.Res Int. **2014** (2014): 230183

Chen, J. et al., Cancer Cell **19** (2011): 541-555

Chen, M. F. et al., J Mol.Med **87** (2009): 307-320

Chen, P. et al., J Mol.Histol. **43** (2012): 63-70

Chen, Q. et al., Mediators.Inflamm. **2013** (2013): 928315

Chen, Z. S. et al., FEBS J **278** (2011): 3226-3245

Cheon, D. J. et al., Clin.Cancer Res. **20** (2014): 711-723

Chiquet-Ehrismann, R., Semin.Cancer Biol. **4** (1993): 301-310

Chiquet-Ehrismann, R. et al., J Pathol. **200** (2003): 488-499

Cho, N. H. et al., Oncogene **23** (2004): 845-851

Choi, K. U. et al., Int J Cancer (2010)

Chung, F. Y. et al., J Surg.Oncol **102** (2010): 148-153

Cirak, Y. et al., Med.Oncol **30** (2013): 526

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

Conde-Perezprina, J. C. et al., Oxid.Med.Cell Longev. **2012** (2012): 728430

Cooper, C. R. et al., J Cell Biochem. **104** (2008): 2298-2309

Cooper, W. A. et al., Histopathology **55** (2009): 28-36

Cordes, C. et al., Anticancer Res **30** (2010): 3541-3547

Creighton, C. J. et al., Mol.Cancer Res **3** (2005): 119-129

Da Forno, P. D. et al., Clinical Cancer Research **14** (2008): 5825-5832

Dai, T. Y. et al., J Exp.Clin Cancer Res **33** (2014): 64

Davidson, N. O., Keio J Med. **56** (2007): 14-20

de Souza Meyer, E. L. et al., Clin Endocrinol.(Oxf) **62** (2005): 672-678

De, Boeck A. et al., Proteomics. **13** (2013): 379-388

De, Luca P. et al., Mol Cancer Res **9** (2011): 1078-1090

De, Vriendt, V et al., Biomarkers **18** (2013): 516-524

Deeley, R. G. et al., Physiol Rev. **86** (2006): 849-899

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

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

Denli, A. M. et al., Nature **432** (2004): 231-235

Denys, H. et al., Br.J Cancer **90** (2004): 1443-1449

Dharmavaram, R. M. et al., Matrix Biol. **16** (1998): 343-348

Dolznig, H. et al., Cancer Immun. **5** (2005): 10

Dong, S. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. **64** (2005): 948-955

Drucker, K. L. et al., Genes Chromosomes.Cancer **48** (2009): 854-864

Dulak, A. M. et al., Nat Genet. **45** (2013): 478-486

Egloff, A. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **1062** (2005): 29-40

Ellsworth, R. E. et al., Clin.Exp.Metastasis **26** (2009): 205-213

Escobar-Hoyos, L. F. et al., Mod.Pathol. **27** (2014): 621-630

Espinosa, A. M. et al., PLoS.ONE. **8** (2013): e55975

Ewald, J. A. et al., PLoS.ONE. **8** (2013): e55414

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

Fang, W. Y. et al., Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai) **37** (2005): 541-546

Fang, Z. Q. et al., Genet.Mol.Res. **12** (2013): 1479-1489

Feng, C. J. et al., Anticancer Res **28** (2008): 3763-3769

Findeis-Hosey, J. J. et al., Biotech.Histochem. **87** (2012): 24-29

Findeis-Hosey, J. J. et al., Hum.Pathol. **41** (2010): 477-484

Fiorentini, C. et al., Exp.Cell Res **323** (2014): 100-111

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

Forsey, R. W. et al., Biotechnol.Lett. **31** (2009): 819-823

Freire, J. et al., Pathol.Res.Pract. **210** (2014): 879-884

Fuchs, B. C. et al., Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol **286** (2004): G467-G478

Fuchs, F. et al., Mol Syst.Biol. **6** (2010): 370

Fujita, A. et al., Virchows Arch. **460** (2012): 163-169

Fukuda, T. et al., J Histochem.Cytochem. **55** (2007): 335-345

Fukunaga-Kalabis, M. et al., Oncogene **29** (2010): 6115-6124

Fuller-Pace, F. V., RNA.Biol. **10** (2013): 121-132

Furukawa, T. et al., Sci.Rep. **1** (2011): 161

Furutani, Y. et al., Biochem.J **389** (2005): 675-684

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

Garnett, M. J. et al., Nat.Cell Biol. **11** (2009): 1363-1369

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

Ghosh, S. et al., Gynecol.Oncol **119** (2010): 114-120

Gibbs, M. et al., Am.J Hum.Genet. **64** (1999): 1087-1095

Gilkes, D. M. et al., Mol Cancer Res **11** (2013): 456-466

Gladhaug, I. P. et al., Histopathology **56** (2010): 345-355

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

Gonzalez, A. L. et al., Hum.Pathol. **35** (2004): 840-849

Gooden, M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **108** (2011): 10656-10661

Gorrin Rivas, M. J. et al., Hepatology **28** (1998): 986-993

Gorrin-Rivas, M. J. et al., Ann Surg **231** (2000): 67-73

Graf, F. et al., Mini.Rev.Med.Chem. **10** (2010): 527-539

Graf, M. et al., Eur.J Haematol. **75** (2005): 477-484

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

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

Gregory, K. E. et al., J Bone Miner.Res. **16** (2001): 2005-2016

Grunda, J. M. et al., Clin Cancer Res. **16** (2010): 2890-2898

Grupp, K. et al., Mol Oncol **7** (2013): 1001-1011

Gupta, N. et al., Biochim.Biophys.Acta **1741** (2005): 215-223

Gupta, N. et al., Gynecol.Oncol **100** (2006): 8-13

Hagemann, T. et al., Eur.J Cancer **37** (2001): 1839-1846

Hamamoto, R. et al., Cancer Sci. **97** (2006): 113-118

Han, J. et al., Cell **125** (2006): 887-901

Hannisdal, K. et al., Head Neck **32** (2010): 1354-1362

Hatina, J. et al., Neoplasma **59** (2012): 728-736

He, P. et al., Cancer Sci. **98** (2007): 1234-1240

Hernandez, I. et al., Oncogene **29** (2010): 3758-3769

Hodgson, J. G. et al., Neuro Oncol **11** (2009): 477-487

Hofmann, H. S. et al., Am.J Respir.Crit Care Med. **170** (2004): 516-519

Hofmann, H. S. et al., Clinical Cancer Research **11** (2005): 1086-1092

Hood, F. E. et al., Bioarchitecture. **1** (2011): 105-109

Houghton, A. M. et al., Cancer Research **66** (2006): 6149-6155

Hourihan, R. N. et al., Anticancer Res **23** (2003): 161-165

Hu, Y. et al., Carcinogenesis **34** (2013): 176-182

Huang, C. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **21** (2012a): 166-175

Huang, C. L. et al., J Clin Oncol **23** (2005): 8765-8773

Huang, M. Y. et al., DNA Cell Biol. **31** (2012b): 625-635

Huang, T. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014): 1544-1552

Huo, J. et al., Arch.Dermatol.Res. **302** (2010): 769-772

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

Hwang, Y. S. et al., Head Neck **34** (2012): 1329-1339

Ida-Yonemochi, H. et al., Mod.Pathol. **25** (2012): 784-794

Imadome, K. et al., Cancer Biol.Ther **10** (2010): 1019-1026

Irigoyen, M. et al., Mol.Cancer **9** (2010): 130

Ishikawa, N. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004): 8363-8370

Ishikawa, Y. et al., J Biol.Chem. **283** (2008): 31584-31590

Iuchi, S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 9628-9632

Ivanov, S. V. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **370** (2008): 536-540

Jeng, Y. M. et al., Br.J Surg **96** (2009): 66-73

Jensen, K. et al., J Pathol. **221** (2010): 193-200

Jung, C. K. et al., Pathol.Int **56** (2006): 503-509

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

Kabbarah, O. et al., PLoS.ONE. **5** (2010): e10770

Kadara, H. et al., Cancer Prev.Res (Phila) **2** (2009): 702-711

Kanai, Y. et al., Mol Aspects Med. **34** (2013): 108-120

Kanno, A. et al., Int J Cancer **122** (2008): 2707-2718

Karantza, V., Oncogene **30** (2011): 127-138

Karunakaran, S. et al., J Biol.Chem. **286** (2011): 31830-31838

Kastrinos, F. et al., Semin.Oncol **34** (2007): 418-424

Katagiri, C. et al., J Dermatol.Sci. **57** (2010): 95-101

Katoh, M., Curr.Drug Targets. **9** (2008): 565-570

Katoh, M. et al., Int J Mol.Med **19** (2007): 273-278

Kennedy, A. et al., Int J Cancer **124** (2009): 27-35

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

Kikuchi, A. et al., Acta Physiol (Oxf) **204** (2012): 17-33

Kikuchi, Y. et al., J Histochem.Cytochem. **56** (2008): 753-764

Kim, C. H. et al., Surg Neurol. **54** (2000): 235-240

Kim, C. Y. et al., Oncol.Rep. **27** (2012): 608-620

Kim, E. H. et al., Oncogene **29** (2010a): 4725-4731

Kim, H. S. et al., Korean J Intern.Med. **25** (2010b): 399-407

Kim, S. et al., Korean J Hepatol. **10** (2004): 62-72

Kitahara, O. et al., Cancer Res. **61** (2001): 3544-3549

Knight, H. M. et al., Am J Hum.Genet. **85** (2009): 833-846

Korosec, B. et al., Cancer Genet.Cytogenet. **171** (2006): 105-111

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

Kuan, C. T. et al., Clinical Cancer Research **12** (2006): 1970-1982

Kuang, S. Q. et al., Leukemia **22** (2008): 1529-1538

Kubo, H. et al., BMC.Cancer **14** (2014): 755

Kudo, Y. et al., Cancer Research **66** (2006): 6928-6935

Kwon, O. H. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **406** (2011): 539-545

Kwon, Y. J. et al., Oncol Res **18** (2009): 141-151

Labied, S. et al., Hum.Reprod. **24** (2009): 113-121

Ladanyi, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. **56** (2007): 1459-1469

Lamba, J. K. et al., Pharmacogenomics. **15** (2014): 1565-1574

Langbein, L. et al., J Biol.Chem. **285** (2010): 36909-36921

Langenskiold, M. et al., Scand.J Gastroenterol. **48** (2013): 563-569

Lau, E. et al., EMBO Rep. **7** (2006): 425-430

Lee, J. I. et al., World J Gastroenterol. **18** (2012): 4751-4757

Lee, Y. et al., Nature **425** (2003): 415-419

Lee, Y. K. et al., Br.J Cancer **101** (2009): 504-510

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

Li, C. et al., Proteomics. **6** (2006): 547-558

Li, H. G. et al., J Craniofac.Surg. **22** (2011): 2022-2025

Li, J. et al., Cancer Biol.Ther. **10** (2010a): 617-624

Li, J. Q. et al., Int.J Oncol **22** (2003): 1101-1110

Li, M. et al., Lung Cancer **69** (2010b): 341-347

Li, X. et al., Neoplasma **59** (2012): 500-507

Li, Y. N. et al., APMIS **122** (2014): 140-146

Liang, W. J. et al., Ai.Zheng. **27** (2008a): 460-465

Liang, Y. et al., J Neurooncol. **86** (2008b): 133-141

Liao, B. et al., J Biol.Chem. **286** (2011): 31145-31152

Liao, B. et al., J Biol.Chem. **280** (2005): 18517-18524

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

Lim, J. H. et al., J Cell Biochem. **105** (2008): 1117-1127

Lin, D. M. et al., Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi. **35** (2006): 540-544

Lindskog, C. et al., FASEB J (2014)

Litjens, S. H. et al., Trends Cell Biol. **16** (2006): 376-383

Liu, J. et al., Pathol.Res Pract. **206** (2010): 602-606

Liu, T. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e45464

Liu, Z. et al., Mol Neurobiol. **47** (2013): 325-336

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

Loh, E. et al., J Biol.Chem. **279** (2004): 24640-24648

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

Lu, D. et al., Am.J Surg.Pathol. **35** (2011): 1638-1645

Lu, Y. et al., Am.J Transl.Res **3** (2010): 8-27

Lugassy, C. et al., J Cutan.Pathol. **36** (2009): 1237-1243

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)

Lv, M. et al., Exp.Lung Res. **41** (2015): 74-83

Ma, L. J. et al., Arch.Med Res **40** (2009): 114-123

Ma, T. S. et al., Cell Calcium **26** (1999): 25-36

Ma, Y. et al., Clinical Cancer Research **12** (2006): 1121-1127

Maciejczyk, A. et al., J Histochem.Cytochem. **61** (2013): 330-339

Mackie, E. J. et al., J Cell Biol. **107** (1988): 2757-2767

MacLennan, D. H. et al., J Biol.Chem. **272** (1997): 28815-28818

Maeder, C. et al., Nat Struct.Mol.Biol. **16** (2009): 42-48

Mahdi, K. M. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **14** (2013): 3403-3409

Manda, R. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **275** (2000): 440-445

Mansilla, F. et al., J Mol Med.(Berl) **87** (2009): 85-97

Marchand, M. et al., Int.J.Cancer **80** (1999): 219-230

Marchand, M. et al., Int.J Cancer **63** (1995): 883-885

McClelland, S. E. et al., EMBO J **26** (2007): 5033-5047

McManus, K. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **106** (2009): 3276-3281

Merscher, S. et al., Front Endocrinol.(Lausanne) **5** (2014): 127

Metz, R. L. et al., Breast Cancer Res **9** (2007): R58

Metz, R. L. et al., Cell Cycle **4** (2005): 315-322

Meyer, E. L. et al., Mol.Cell Endocrinol. **289** (2008): 16-22

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

Middel, P. et al., BMC.Cancer **10** (2010): 578

Mikami, T. et al., Oral Oncol. **47** (2011): 497-503

Miller, N. H. et al., Hum.Hered. **74** (2012): 36-44

Milovanovic, T. et al., Int.J Oncol **25** (2004): 1337-1342

Mochizuki, S. et al., Cancer Sci. **98** (2007): 621-628

Morgan, R. A. et al., Science (2006)

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

Morita, Y. et al., J Hepatol. **59** (2013): 292-299

Morris, M. R. et al., Oncogene **29** (2010): 2104-2117

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

Moss, D. K. et al., J Cell Sci. **122** (2009): 644-655

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

Murakami, M. et al., J Clin Endocrinol.Metab **85** (2000): 4403-4406

Nag, A. et al., RNA.Biol. **9** (2012): 334-342

Narita, D. et al., Rom.J Morphol.Embryol. **52** (2011): 1261-1267

Nestle, F. O. et al., Nat Med. **4** (1998): 328-332

Nicastri, A. et al., J Proteome.Res (2014)

Niehof, M. et al., Gastroenterology **134** (2008): 1191-1202

Nishinakamura, R. et al., Pediatr.Nephrol. **26** (2011): 1463-1467

Noda, T. et al., Liver Int. **32** (2012): 110-118

Nones, K. et al., Int.J Cancer **135** (2014): 1110-1118

Odermatt, A. et al., Nat Genet. **14** (1996): 191-194

Oh, S. P. et al., Genomics **14** (1992): 225-231

Ohta, S. et al., Oncol Rep. **8** (2001): 1063-1066

Ortega, P. et al., Int.J Oncol **36** (2010): 1209-1215

Ostroff, R. M. et al., PLoS.ONE. **5** (2010): e15003

Park, S. H. et al., Clinical Cancer Research **13** (2007): 858-867

Paron, I. et al., PLoS.ONE. **6** (2011): e21684

Pascreau, G. et al., J Biol.Chem. **284** (2009): 5497-5505

Patterson, C. E. et al., Cell Stress.Chaperones. **10** (2005): 285-295

Patterson, C. E. et al., Mol.Biol.Cell **11** (2000): 3925-3935

Pernemalm, M. et al., J Proteome.Res **12** (2013): 3934-3943

Perrin-Tricaud, C. et al., PLoS.ONE. **6** (2011): e29390

Perumal, D. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e43589

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

Plones, T. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e41746

Pokrovskaya, I. D. et al., Glycobiology **21** (2011): 1554-1569

Pontisso, P. et al., Br.J Cancer **90** (2004): 833-837

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

Prades, C. et al., Cytogenet.Genome Res **98** (2002): 160-168

Prasad, P. et al., BMC.Med.Genet. **11** (2010): 52

Puppin, C. et al., J Endocrinol. **197** (2008): 401-408

Puri, V. et al., Biol.Psychiatry **61** (2007): 873-879

Puyol, M. et al., Cancer Cell **18** (2010): 63-73

Qin, C. et al., Mol Med.Rep. **9** (2014): 851-856

Qu, P. et al., Cancer Research **69** (2009): 7252-7261

Quaas, M. et al., Cell Cycle **11** (2012): 4661-4672

Rajkumar, T. et al., BMC.Cancer **11** (2011): 80

Ramakrishna, M. et al., PLoS.ONE. **5** (2010): e9983

Ramirez, N. E. et al., J Clin Invest **121** (2011): 226-237

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

Reinmuth, N. et al., Dtsch.Med.Wochenschr. **140** (2015): 329-333

Renkonen, S. et al., Head Neck (2012)

Rettig, W. J. et al., Cancer Research **53** (1993): 3327-3335

Rettig, W. J. et al., Int J Cancer **58** (1994): 385-392

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

Ripka, S. et al., Carcinogenesis **28** (2007): 1178-1187

Ritzenthaler, J. D. et al., Mol Biosyst. **4** (2008): 1160-1169

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

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

Rodningen, O. K. et al., Radiother.Oncol **86** (2008): 314-320

Roemer, A. et al., Oncol Rep. **11** (2004a): 529-536

Roemer, A. et al., J Urol. **172** (2004b): 2162-2166

Romagnoli, S. et al., Am J Pathol. **174** (2009): 762-770

Rose, A. A. et al., Mol Cancer Res **5** (2007): 1001-1014

Rotty, J. D. et al., J Cell Biol. **197** (2012): 381-389

Ruan, K. et al., Cell Mol.Life Sci. **66** (2009): 2219-2230

S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011)

Sagara, N. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **252** (1998): 117-122

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

Sakuntabhai, A. et al., Nat Genet. **21** (1999): 271-277

Samanta, S. et al., Oncogene **31** (2012): 4689-4697

Sameer, A. S. et al., Eur.J Cancer Prev. **23** (2014): 246-257

Sandel, M. H. et al., Clinical Cancer Research **11** (2005): 2576-2582

Sang, Q. X., Cell Res **8** (1998): 171-177

Sarai, N. et al., Nucleic Acids Res. **36** (2008): 5441-5450

Satow, R. et al., Clinical Cancer Research **16** (2010): 2518-2528

Scanlan, M. J. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **91** (1994): 5657-5661

Schalken, J. A. et al., Urology **62** (2003): 11-20

Schegg, B. et al., Mol.Cell Biol. **29** (2009): 943-952

Schleypen, J. S. et al., Int.J Cancer **106** (2003): 905-912

Schneider, D. et al., Biochim.Biophys.Acta **1588** (2002): 1-6

Schuetz, C. S. et al., Cancer Research **66** (2006): 5278-5286

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

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

Shaikhibrahim, Z. et al., Int.J Mol Med. **28** (2011): 605-611

Shao, G. et al., Cancer Res. **66** (2006): 4566-4573

Shappell, S. B. et al., Neoplasia. **3** (2001): 287-303

Shepherd, F. A. et al., J Clin.Oncol. **31** (2013): 2173-2181

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

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

Sheu, B. C. et al., Cancer Res. **65** (2005): 2921-2929

Shigeishi, H. et al., Int J Oncol **34** (2009): 1565-1571

Shimbo, T. et al., PLoS.ONE. **5** (2010): e10566

Shubbar, E. et al., BMC.Cancer **13** (2013): 1

Shyian, M. et al., Exp.Oncol **33** (2011): 94-98

Silva, F. C. et al., Sao Paulo Med.J **127** (2009): 46-51

Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542

Simpson, N. E. et al., Breast Cancer Res.Treat. **133** (2012): 959-968

Singh, R., Br.J Cancer **83** (2000): 1654-1658

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

Siu, A. et al., Anticancer Res. **32** (2012): 3683-3688

Slack, F. J. et al., N.Engl.J Med. **359** (2008): 2720-2722

Slany, A. et al., J Proteome.Res **13** (2014): 844-854

Sloan, J. L. et al., J Biol.Chem. **274** (1999): 23740-23745

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

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

Smith, S. C. et al., Am J Pathol. **174** (2009b): 371-379

Solomon, S. et al., Cancer J **18** (2012): 485-491

Spataro, V. et al., Anticancer Res **22** (2002): 3905-3909

Spataro, V. et al., J Biol.Chem. **272** (1997): 30470-30475

Starzyk, R. M. et al., J Infect.Dis. **181** (2000): 181-187

Steffens, S. et al., Oncol Lett. **3** (2012): 787-790

Stuart, J. E. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. (2010)

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

Suminami, Y. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **181** (1991): 51-58

Suvasini, R. et al., J Biol.Chem. **286** (2011): 25882-25890

Takanami, I. et al., Int J Biol.Markers **23** (2008): 182-186

Takashima, S. et al., Tumour.Biol. **35** (2014): 4257-4265

Tanaka, S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **95** (1998): 10164-10169

Terabayashi, T. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e39714

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

Thierry, L. et al., J Mol.Histol. **35** (2004): 803-810

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

Thurner, B. et al., J Exp.Med **190** (1999): 1669-1678

Tischler, V. et al., BMC.Cancer **10** (2010): 273

Tondreau, T. et al., BMC.Genomics **9** (2008): 166

Tong, W. G. et al., Epigenetics. **5** (2010): 499-508

Torre, G. C., Tumour.Biol. **19** (1998): 517-526

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

Travis, W. D. et al., J Clin.Oncol. **31** (2013): 992-1001

Troy, T. C. et al., Stem Cell Rev. **7** (2011): 927-934

Tsai, J. R. et al., Lung Cancer **56** (2007): 185-192

Tseng, H., Front Biosci. **3** (1998): D985-D988

Tseng, H. et al., J Cell Sci. **112 Pt 18** (1999): 3039-3047

Tseng, H. et al., J Cell Biol. **126** (1994): 495-506

Tsuji, A. et al., Biochem.J **396** (2006): 51-59

Tsukamoto, Y. et al., J Pathol. **216** (2008): 471-482

Uchiyama, Y. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **107** (2010): 9240-9245

Ullman, E. et al., Mol.Cell Biol. **31** (2011): 2902-2919

Urquidi, V. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e37797

Utispan, K. et al., Mol.Cancer **9** (2010): 13

van, Asseldonk M. et al., Genomics **66** (2000): 35-42

Vazquez-Ortiz, G. et al., BMC.Cancer **5** (2005): 68

Vermeulen, K. et al., Cell Prolif. **36** (2003): 131-149

Vilar, E. et al., Nat Rev.Clin Oncol **7** (2010): 153-162

von, Au A. et al., Neoplasia. **15** (2013): 925-938

Waalkes, S. et al., BMC.Cancer **10** (2010): 503

Walchli, C. et al., J Cell Sci. **107 (Pt 2)** (1994): 669-681

Wallace, A. M. et al., COPD. **5** (2008): 13-23

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

Walter S et al., J Immunother (SITC Annual Meeting 2011) **35**, (2012)

Wang, H. Y. et al., Cancer Lett. **191** (2003): 229-237

Wang, L. et al., J Thorac.Dis. **6** (2014): 1380-1387

Wang, Q. et al., J Natl.Cancer Inst. **105** (2013a): 1463-1473

Wang, S. Z. et al., BMB.Rep. **41** (2008): 294-299

Wang, W. X. et al., Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban. **40** (2009): 857-860

Wang, Y. F. et al., Tumour.Biol. **34** (2013b): 1685-1689

Warner, S. L. et al., Clinical Cancer Research **15** (2009): 6519-6528

Watanabe, M. et al., Proteomics.Clin Appl. **2** (2008): 925-935

Watt, S. L. et al., J Biol.Chem. **267** (1992): 20093-20099

Wawrzynska, L. et al., Monaldi Arch.Chest Dis. **59** (2003): 140-145

Weeraratna, A. T. et al., Cancer Cell **1** (2002): 279-288

Weiner, L. et al., Differentiation **63** (1998): 263-272

Wen, G. et al., Cancer Lett. **308** (2011): 23-32

Wildeboer, D. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. **65** (2006): 516-527

Wilke, S. et al., BMC.Biol. **10** (2012): 62

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

Willett, R. et al., Nat Commun. **4** (2013): 1553

World Cancer Report, (2014)

Wu, A. et al., J Transl.Med. **9** (2011): 38

Wu, D. et al., Mol.Med.Rep. **10** (2014a): 2415-2420

Wu, G. C. et al., Ai.Zheng. **27** (2008): 874-878

Wu, H. et al., J Biol.Chem. **275** (2000): 36957-36965

Wu, J. et al., BMC.Clin Pathol. **13** (2013a): 15

Wu, K. D. et al., Am.J Physiol **269** (1995): C775-C784

Wu, M. et al., BMC.Cancer **13** (2013b): 44

Wu, S. Q. et al., Mol.Med.Rep. **7** (2013c): 875-880

Wu, Y. H. et al., Oncogene **33** (2014b): 3432-3440

Xiao, L. et al., Biochem.J **403** (2007): 573-581

Xiao, X. et al., Gynecol.Oncol **132** (2014): 506-512

Xiao, X. Y. et al., Tumour.Biol. **33** (2012): 2385-2392

Xiong, D. et al., Carcinogenesis **33** (2012): 1797-1805

Xu, B. et al., Br.J Cancer **109** (2013): 1279-1286

Xu, X. Y. et al., Pathol.Res Pract. (2014)

Xu, Y. et al., PLoS.ONE. **6** (2011): e21119

Yamamoto, H. et al., Oncogene **29** (2010): 2036-2046

Yan, Z. et al., Biomark.Insights. **9** (2014): 67-76

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

Yasui, W. et al., Cancer Sci. **95** (2004): 385-392

Ye, H. et al., BMC.Genomics **9** (2008): 69

Yin, J. Y. et al., Clin Exp.Pharmacol.Physiol **38** (2011): 632-637

Yoon, H. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **99** (2002): 15632-15637

Yoshida, K. et al., J Cell Sci. **123** (2010): 225-235

Younes, M. et al., Anticancer Res **20** (2000): 3775-3779

Yu, D. et al., Int.J Mol Sci. **14** (2013): 11145-11156

Yu, J. et al., Gut (2014)

Yu, J. M. et al., Cancer Lett. **257** (2007): 172-181

Yuan, A. et al., APMIS **116** (2008): 445-456

Yuzugullu, H. et al., Mol.Cancer **8** (2009): 90

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

Zeitlin, S. G. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **106** (2009): 15762-15767

Zhang, C. et al., PLoS.ONE. **6** (2011): e23849

Zhang, C. et al., Am.J Clin Pathol. **142** (2014): 320-324

Zhang, H. et al., J Clin Endocrinol.Metab **89** (2004): 748-755

Zhang, J. et al., Front Biosci.(Elite.Ed) **2** (2010a): 1154-1163

Zhang, J. Y. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **12** (2003): 136-143

Zhang, L. et al., Am.J Pathol. **182** (2013): 2048-2057

Zhang, Y. et al., J Cell Sci. **123** (2010b): 1285-1294

Zhang, Y. et al., J Surg Res **160** (2010c): 102-106

Zhao, C. et al., Am.J Hum.Genet. **85** (2009a): 617-627

Zhao, H. et al., Cancer Gene Ther **21** (2014a): 448-455

Zhao, W. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014b): 4247-4253

Zhao, Y. et al., Mol.Carcinog. **45** (2006): 84-92

Zhao, Y. et al., Radiat.Res. **162** (2004): 655-659

Zhao, Y. et al., Anat.Rec.(Hoboken.) **292** (2009b): 692-700

Zhao, Z. et al., Genomics **27** (1995): 370-373

Zheng, P. S. et al., FASEB J **18** (2004): 754-756

Zhou, X. et al., Exp.Mol Pathol. **92** (2012): 105-110

Zong, J. et al., Clin.Transl.Oncol. **14** (2012): 21-30

Zou, J. N. et al., Cancer Lett. **280** (2009): 78-85

Zou, T. T. et al., Oncogene **21** (2002): 4855-4862

Allen, M. D. et al., Clin Cancer Res. 20 (2014): 344-357

Ammendola, M. et al., Biomed.Res.Int. **2014** (2014): 154702

An, J. et al., Mol Cancer **7** (2008): 32

Angenieux, C. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e42634

Arafeh, R. et al., Nat Genet. **47** (2015): 1408-1410

Atkins, D. et al., Contrib.Nephrol. **148** (2005): 35-56

Barras, D. et al., Int.J Cancer **135** (2014): 242-247

Barros-Filho, M. C. et al., J Clin Endocrinol.Metab **100** (2015): E890-E899

Beaudry, V. G. et al., PLoS.Genet. **6** (2010): e1001168

Beckmann, R. P. et al., Science **248** (1990): 850-854

Bengtsson, L. et al., J Cell Sci. **121** (2008): 536-548

Bloch, D. B. et al., J Biol Chem **271** (1996): 29198-29204

Bosch, D. G. et al., Eur.J Hum.Genet. (2015)

Boyer, A. P. et al., Mol.Cell Proteomics. **12** (2013): 180-193

Brooks, W. S. et al., J Biol Chem **283** (2008): 22304-22315

Bukau, B. et al., Cell **92** (1998): 351-366

Burger, M., Dig.Dis.Sci. **54** (2009): 197-198

Cailliau, K. et al., J Biol Chem **290** (2015): 19653-19665

Cao, Q. F. et al., Cancer Biother.Radiopharm. **30** (2015): 87-93

Chakrabarti, G. et al., Cancer Metab **3** (2015): 12

Chalitchagorn, K. et al., Oncogene **23** (2004): 8841-8846

Chen, K. et al., Cancer Biol Ther. **12** (2011): 1114-1119

Chen, S. J. et al., J Biol.Chem **289** (2014): 36284-36302

Chen, Y. Z. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. **70** (2012): 637-644

Chevrollier, A. et al., Biochim.Biophys.Acta **1807** (2011): 562-567

Chouchane, L. et al., Cancer **80** (1997): 1489-1496

Ciocca, D. R. et al., Cell Stress.Chaperones. **10** (2005): 86-103

Ciocca, D. R. et al., Cancer Res. **52** (1992): 3648-3654

Cipriano, R. et al., Mol.Cancer Res. **12** (2014): 1156-1165

Cortese, R. et al., Int.J Biochem.Cell Biol **40** (2008): 1494-1508

Critchley-Thorne, R. J. et al., PLoS.Med. **4** (2007): e176

Das, M. et al., PLoS.ONE. **8** (2013): e69607

Decker, T. et al., J Clin Invest **109** (2002): 1271-1277

Di, K. et al., Oncogene **32** (2013): 5038-5047

Dolce, V. et al., FEBS Lett. **579** (2005): 633-637

Draberova, E. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. **74** (2015): 723-742

Dunwell, T. L. et al., Epigenetics. **4** (2009): 185-193

Dusek, R. L. et al., Breast Cancer Res **14** (2012): R65

Ene, C. I. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e51407

Espinal-Enriquez, J. et al., BMC.Genomics **16** (2015): 207

Evert, M. et al., Br.J Cancer **109** (2013): 2654-2664

Fellenberg, F. et al., J Invest Dermatol. **122** (2004): 1510-1517

Feng, F. et al., Mol.Cancer **9** (2010): 90

Ferrer-Ferrer, M. et al., Arch.Med.Res **44** (2013): 467-474

Fischer, H. et al., Carcinogenesis **22** (2001): 875-878

Freiss, G. et al., Bull.Cancer **91** (2004): 325-332

Freiss, G. et al., Anticancer Agents Med.Chem **11** (2011): 78-88

Friedman, E., Pathobiology **63** (1995): 348-350

Fu, B. S. et al., Nan.Fang Yi.Ke.Da.Xue.Xue.Bao. **29** (2009): 1775-1778

Gallerne, C. et al., Int.J Biochem.Cell Biol **42** (2010): 623-629

Garg, M. et al., Cancer **116** (2010a): 3785-3796

Garg, M. et al., Cancer **116** (2010b): 3785-3796

Garg, M. et al., Eur.J Cancer **46** (2010c): 207-215

Gautier, T. et al., FASEB J **24** (2010): 3544-3554

Giaginis, C. et al., Dig.Dis.Sci. **56** (2011): 777-785

Giovannini, D. et al., Cell Rep. **3** (2013): 1866-1873

Gokmen-Polar, Y. et al., Mod.Pathol. **28** (2015): 677-685

Guo, H. et al., Cancer Research **71** (2011): 7576-7586

Haffner, C. et al., EMBO J **23** (2004): 3041-3050

Hartl, F. U. et al., Science **295** (2002): 1852-1858

Hatfield, M. P. et al., Protein Pept.Lett. **19** (2012): 616-624

Hayward, A. et al., PLoS.ONE. **8** (2013): e59940

Hillier, L. W. et al., Nature **424** (2003): 157-164

Hsiung, D. T. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **16** (2007): 108-114

Huang, F. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014a): 1093-1100

Huang, G. et al., Anticancer Agents Med.Chem **14** (2014b): 9-17

Huang, L. et al., Int.J Gynecol.Cancer **25** (2015a): 559-565

Huang, S. et al., Oncogene **21** (2002): 2504-2512

Huang, X. et al., Cancer Cell Int. **15** (2015b): 93

Imada, A. et al., Eur.Respir.J **15** (2000): 1087-1093

Inoue, J. et al., PLoS.ONE. **4** (2009): e7099

Ishii, M. et al., Anticancer Res. **27** (2007): 3987-3992

Ito, Y. et al., J Biochem. **124** (1998): 347-353

Jalbout, M. et al., Cancer Lett. **193** (2003): 75-81

Jia, W. H. et al., Nat.Genet. **45** (2013): 191-196

Jie, Liu et al., Pathol.Res Pract. **210** (2014): 176-181

Jin, X. et al., Tumour.Biol (2015)

Johnson, M. et al., Cell Signal. **21** (2009): 1471-1478

Kankavi, O. et al., Ren Fail. **36** (2014): 258-265

Kao, R. H. et al., Int.J Exp.Pathol. **84** (2003): 207-212

Kim, H. S. et al., Korean J Intern.Med. **25** (2010): 399-407

Kobayashi, K. et al., Oncogene **23** (2004): 3089-3096

Kong, C. S. et al., Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol. **115** (2013): 95-103

Kortum, K. M. et al., Ann.Hematol. **94** (2015): 1205-1211

Kozak, C. A., Retrovirology. **7** (2010): 101

Kresse, S. H. et al., Mol.Cancer **7** (2008): 48

Kukita, K. et al., J Immunol. **194** (2015): 4988-4996

Kutomi, G. et al., Cancer Sci. **104** (2013): 1091-1096

Kwok, H. F. et al., Am.J Cancer Res **5** (2015): 52-71

Lai, C. H. et al., Genome Res **10** (2000): 703-713

Lan, Q. et al., Eur.J Haematol. **85** (2010): 492-495

Lange, A. et al., Exp.Dermatol. **18** (2009): 527-535

Lazaris, A. C. et al., Breast Cancer Res.Treat. **43** (1997): 43-51

Lee, K. Y. et al., Yonsei Med.J **50** (2009): 60-67

Leypoldt, F. et al., J Neurochem. **76** (2001): 806-814

Li, Q. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **8** (2015): 6334-6344

Li, Y. et al., Neoplasia. **7** (2005): 1073-1080

Liang, B. et al., Clin Cancer Res. **21** (2015): 1183-1195

Liu, B. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e43147

Liu, L. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **372** (2008): 756-760

Liu, Y. et al., Cancer Research **69** (2009): 7844-7850

Lv, Q. et al., Tumour.Biol **36** (2015): 3751-3756

Lynch, E. M. et al., Curr.Biol **24** (2014): 896-903

Ma, J. et al., Cell Physiol Biochem. **37** (2015): 201-213

Maitra, M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **109** (2012): 21064-21069

Manuel, A. et al., Genomics **64** (2000): 216-220

Martin, C. et al., J Virol. **87** (2013): 10094-10104

May, D. et al., Oncogene **24** (2005): 1011-1020

Medhi, S. et al., J Viral Hepat. **20** (2013): e141-e147

Mei, J. et al., Oncogene **25** (2006): 849-856

Mestiri, S. et al., Cancer **91** (2001): 672-678

Meulmeester, E. et al., Curr.Cancer Drug Targets. **8** (2008): 87-97

Mimoto, R. et al., Cancer Lett. **339** (2013): 214-225

Mitsuhashi, A. et al., Am.J Pathol. **182** (2013): 1843-1853

Moudry, P. et al., Cell Cycle **11** (2012): 1573-1582

Mungall, A. J. et al., Nature **425** (2003): 805-811

Nagamachi, A. et al., Cancer Cell **24** (2013): 305-317

Nagao, H. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e39268

Narita, N. et al., Int.J Radiat.Oncol Biol Phys. **53** (2002): 190-196

Neben, K. et al., Int.J Cancer **120** (2007): 1669-1677

Nebral, K. et al., Clinical Cancer Research **11** (2005): 6489-6494

Nibbe, R. K. et al., Mol.Cell Proteomics. **8** (2009): 827-845

Nieto, C. et al., J Cell Sci. **123** (2010): 2001-2007

Niikura, T. et al., Eur.J Neurosci. **17** (2003): 1150-1158

Nirde, P. et al., Oncogene **29** (2010): 117-127

Nonomura, N. et al., Br.J Cancer **97** (2007): 952-956

Noonan, E. J. et al., Cell Stress.Chaperones. **12** (2007): 219-229

Ohbayashi, N. et al., J Cell Sci. **125** (2012): 1508-1518

Ohiro, Y. et al., FEBS Lett. **524** (2002): 163-171

Onishi, H. et al., Cancer Lett. **371** (2016): 143-150

Orfanelli, U. et al., Oncogene **34** (2015): 2094-2102

Ostertag, E. M. et al., Annu.Rev Genet. **35** (2001): 501-538

Papadopoulos, C. et al., J Biol.Chem **286** (2011): 5494-5505

Park, H. J. et al., J Proteome.Res **7** (2008): 1138-1150

Peng, L. et al., Sci.Rep. **5** (2015): 13413

Penzo, M. et al., Oncotarget. **6** (2015): 21755-21760

Permuth-Wey, J. et al., Nat Commun. **4** (2013): 1627

Peters, U. et al., Gastroenterology **144** (2013): 799-807

Qian, J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **112** (2015a): 3469-3474

Qian, J. et al., Genom.Data **5** (2015b): 272-274

Rachel, R. A. et al., PLoS.ONE. **7** (2012): e42446

Ramana, C. V. et al., EMBO J **19** (2000): 263-272

Reis, A. et al., Nat Genet. **6** (1994): 174-179

Ribatti, D. et al., Int.J Exp.Pathol. **91** (2010): 350-356

Roe, O. D. et al., Lung Cancer **67** (2010): 57-68

Rohde, M. et al., Genes Dev. **19** (2005): 570-582

Ruediger, R. et al., Oncogene **20** (2001): 1892-1899

Rusin, M. et al., Mol.Carcinog. **39** (2004): 155-163

Schiebel, E., Curr.Opin.Cell Biol **12** (2000): 113-118

Schmidt, F. et al., Aging (Albany.NY) **7** (2015a): 527-528

Schmidt, F. et al., Oncotarget. **6** (2015b): 617-632

Schulz, E. G. et al., Immunity. **30** (2009): 673-683

Scieglinska, D. et al., J Cell Biochem. **104** (2008): 2193-2206

Sedlackova, L. et al., Tumour.Biol **32** (2011): 33-44

Sfar, S. et al., Hum.Immunol. **71** (2010): 377-382

Shain, A. H. et al., BMC.Genomics **14** (2013): 624

Sharma, P. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. **399** (2010): 129-132

Sherman, M., Ann.N.Y.Acad.Sci. **1197** (2010): 152-157

Simon, R. et al., Int J Cancer **107** (2003): 764-772

Singh, S. et al., Tumour.Biol **35** (2014): 12695-12706

Siragam, V. et al., PLoS.ONE. **9** (2014): e109128

Slepak, T. I. et al., Cytoskeleton (Hoboken.) **69** (2012): 514-527

Souza, A. P. et al., Cell Stress.Chaperones. **14** (2009): 301-310

Stawerski, P. et al., Contemp.Oncol (Pozn.) **17** (2013): 378-382

Szondy, K. et al., Cancer Invest **30** (2012): 317-322

Taira, N. et al., Mol.Cell **25** (2007): 725-738

Takahashi, M. et al., Gan To Kagaku Ryoho **24** (1997): 222-228

Takanami, I. et al., Cancer **88** (2000): 2686-2692

Tan, S. et al., Breast Cancer Res **16** (2014): R40

Tanis, T. et al., Arch.Oral Biol **59** (2014): 1155-1163

Toyoda, E. et al., J Biol.Chem. **283** (2008): 23711-23720

Van Aarsen, L. A. et al., Cancer Res. **68** (2008): 561-570

van den Boom, J. et al., Am.J Pathol. **163** (2003): 1033-1043

van den Heuvel, A. P. et al., Cancer Biol Ther. **13** (2012): 1185-1194

van, Wesenbeeck L. et al., J Bone Miner.Res **19** (2004): 183-189

Vargas, A. C. et al., Breast Cancer Res.Treat. **135** (2012): 153-165

Vargas-Roig, L. M. et al., Int.J Cancer **79** (1998): 468-475

von der, Heyde S. et al., PLoS.ONE. **10** (2015): e0117818

Vuletic, S. et al., Biochim.Biophys.Acta **1813** (2011): 1917-1924

Wang, Q. et al., Int.J Biol Sci. **10** (2014a): 807-816

Wang, T. et al., Clin Transl.Oncol **17** (2015): 564-569

Wang, W. M. et al., Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi. **22** (2014b): 1744-1747

Wang, X. et al., Clin Chim.Acta **417** (2013a): 73-79

Wang, X. M. et al., PLoS.ONE. **8** (2013b): e55714

Wang, X. X. et al., Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int. **12** (2013c): 540-545

Wang, X. X. et al., PLoS.ONE. **9** (2014c): e96501

Wang, Y. et al., Clin Chem.Lab Med. **48** (2010a): 1657-1663

Wang, Y. N. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **399** (2010b): 498-504

Wang, Z. et al., Med.Sci.Monit. **16** (2010c): CR357-CR364

Watson, P. J. et al., Traffic. **5** (2004): 79-88

Wehner, M. et al., FEBS J **277** (2010): 1597-1605

Weinacker, A. et al., J Biol.Chem **269** (1994): 6940-6948

Wu, D. et al., Mol.Med.Rep. **10** (2014): 2415-2420

Wu, M. et al., Oncogene **23** (2004): 6815-6819

Wu, X. S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **109** (2012): E2101-E2109

Xia, F. et al., Am.J Hum.Genet. **94** (2014): 784-789

Xia, L. M. et al., Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi. **16** (2008): 678-682

Xiang, Y. et al., J Clin Invest **125** (2015): 2293-2306

Xu, L. et al., Mol.Cell **10** (2002): 271-282

Xue, L. et al., Cell Physiol Biochem. **36** (2015): 1982-1990

Yamamoto, N. et al., Int.J Oncol **42** (2013): 1523-1532

Yang, D. et al., Cell Physiol Biochem. **27** (2011): 37-44

Yang, Z. et al., Int.J Med.Sci. **12** (2015): 256-263

Yau, C. et al., Breast Cancer Res **12** (2010): R85

Yokoyama, Y. et al., Mol.Med.Rep. **1** (2008): 197-201

Yongjun Zhang, M. M. et al., J Cancer Res Ther. **9** (2013): 660-663

Yu, D. et al., Oncotarget. **6** (2015): 7619-7631

Yu, H. et al., Nat Methods **8** (2011): 478-480

Yu, S. Y. et al., J Oral Pathol.Med. **43** (2014): 344-349

Zekri, A. R. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **16** (2015): 3543-3549

Zhang, W. et al., Tumori **100** (2014): 338-345

Zhao, Y. et al., Oncol Lett. **4** (2012): 755-758

Zhao-Yang, Z. et al., Cancer Lett. **266** (2008): 209-215

Zhou, J. R. et al., Zhonghua Er.Bi Yan.Hou Tou.Jing.Wai Ke.Za Zhi. **42** (2007): 934-938

Zhou, L. et al., FEBS Lett. **584** (2010): 3013-3020