

I33232WO

Inmunoterapia con péptidos restringidos a B*07 y una combinación de péptidos contra el cáncer y métodos relacionados

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

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012 el cáncer fue una de las cuatro principales enfermedades mortales no contagiosas en el mundo. Ese mismo año, el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y el cáncer del aparato respiratorio se situaron entre las 10 primeras causas de muerte en los países de renta alta.

En 2012, se calcula que en todo el mundo hubo 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, 32,6 millones de pacientes aquejados de cáncer (diagnosticado en los 5 años anteriores)

y 8,2 millones de fallecimientos a causa de esta enfermedad (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

En los grupos de cáncer de cerebro, leucemia y cáncer de pulmón la invención de interés compete específicamente al glioblastoma, a la leucemia linfocítica crónica (LLC) y la leucemia mieloide aguda (LME), así como al cáncer de pulmón microcítico y amicrocítico (CPM y CPNM), respectivamente.

El glioblastoma es la neoplasia maligna del sistema nervioso central más frecuente, con una incidencia ajustada a la edad de 3,19 por 100.000 habitantes en Estados Unidos. El glioblastoma tiene un pronóstico muy desfavorable, con un índice de supervivencia a 1 año del 35% y a 5 años inferior al 5%. El sexo masculino, la edad y la etnia parecen ser factores de riesgo del mismo (Thakkar et al., 2014).

La LLC es la leucemia más común en el mundo occidental, donde supone alrededor de un tercio de todos los casos de leucemia. La incidencia es similar en EE.UU. y Europa, y los casos nuevos se calculan en torno a 16.000 cada año. La LLC afecta con más frecuencia a las personas de raza blanca que a las de origen africano, es menos frecuente en los hispanos y los amerindios y muy rara en los asiáticos. En las personas de origen asiático, los índices de incidencia de la LLC son 3 veces menores que en las de raza blanca (Gunawardana et al., 2008). La supervivencia global a cinco años en los pacientes con LLC ronda el 79%.

La LMA es el segundo tipo de leucemia diagnosticado con más frecuencia tanto en los adultos como en los niños. Se calcula que el número de nuevos casos en Estados Unidos ronda los 21.000 cada año. El índice de supervivencia a cinco años de las personas con LMA es de alrededor del 25%.

El cáncer de pulmón es el tipo más habitual de cáncer en el mundo y es la principal causa de muerte por cáncer en muchos países. Se divide en microcítico y amicrocítico. El cáncer de pulmón amicrocítico (CPNM, por sus siglas en inglés) incluye los tipos

histológicos de adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma macrocítico y supone el 85% de todos los casos de cáncer de pulmón en Estados Unidos. La incidencia del CPNM está estrechamente relacionada con la prevalencia del tabaquismo, que abarca tanto a fumadores activos como ex-fumadores, con un índice de supervivencia a cinco años descrito del 15% (Molina et al., 2008; World Cancer Report, 2014).

A la luz de los graves efectos secundarios y de los costes que acarrearán el tratamiento del cáncer, existe la necesidad de descubrir factores que puedan ser usados en el tratamiento oncológico en general y, en particular, en la leucemia mieloide aguda, el cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

Existe asimismo la necesidad de descubrir factores que sirvan como biomarcadores oncológicos para mejorar el diagnóstico, la evaluación del pronóstico y la predicción del éxito terapéutico en el cáncer en general y, en particular, de la leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

La inmunoterapia antitumoral representa una opción de tratamiento dirigido contra las 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 epítomos procesados y posiblemente presentados por los tejidos normales lo sean por debajo del límite necesario para ser reconocidos por los linfocitos T, pero que la sobreexpresión por parte de las células tumorales rompa la tolerancia vigente hasta ese momento y desencadene la respuesta antitumoral. Ejemplos destacados de esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

d) Antígenos específicos de tumor: Estos TAA únicos son fruto de mutaciones de genes normales (como β -catenina, CDK4, etc.) Algunos de esos cambios moleculares están relacionados con la transformación neoplásica y/o su progresión. Los antígenos específicos de tumor generalmente son capaces de inducir potentes respuestas

inmunitarias sin riesgo de reacciones autoinmunitarias contra los tejidos normales. Por otro lado, casi siempre estos TAA solo son relevantes para el mismo tumor exacto en el que fueron identificados y normalmente no se encuentran en muchos otros tumores de su tipo. La especificidad (o asociación) tumoral de un péptido también puede surgir si el péptido procede de un exón del (asociado con) tumor en el caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas con el mismo).

e) TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítomos nuevos en tumores, tal y como sucede con MUC1, o de fenómenos como el ajuste 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 epítomos 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 epítomos, 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 clave en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de los epítomos 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 más largos (alargados) de la invención pueden actuar como epítomos activos para las MHC de clase II.

Los linfocitos T cooperadores, activados por epítomos de MHC de clase II, desempeñan un papel clave en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos 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 epítomos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

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

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células inmunitarias, la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Pero Dengjel y cols. descubrieron varios epítomos 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 + epítomo peptídico) o por los linfocitos T colaboradores CD4+ (ligando: moléculas de MHC de clase II + epítomo 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 algunos prerequisites particulares. 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 epítomos, 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 epítomo de linfocito T. Un prerequisite 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 epítomo 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 epítomos 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 epítipo 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.

En un primer aspecto de la presente invención, ésta se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a la SEQ ID N.º 499 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 las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a la SEQ ID N.º 499, o una secuencia variante que comprende un cambio conservador de la secuencia de aminoácidos en comparación con las SEQ ID N.º 21 a la SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a la SEQ ID N.º 499, en que dichas variantes se unen a MHC y/o estimulan linfocitos T que presentan reactividad cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido el polipéptido entero del que derivaría.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de la presente invención que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a la SEQ ID N.º 499 o una variante de las mismas, 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 las SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a la SEQ ID N.º 499, en que dicho péptido o

una variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente de entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

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. En la Tabla 1a, los péptidos con las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 357 se unen a HLA- B*07. En la Tabla 1b, los péptidos con las SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 497 se unen a HLA- B*07. Los péptidos de la Tabla 2 han sido dados a conocer con anterioridad en grandes listados resultantes del cribado genético ultrarrápido con elevadas tasas de error o son el resultado del cálculo con algoritmos, pero no habían sido vinculados en absoluto con el cáncer hasta ahora. En la Tabla 2a, los péptidos con las SEQ ID N.º 358 a SEQ ID N.º 383 se unen a HLA-B*07. En la Tabla 2b, los péptidos con las SEQ ID NO: 498 a SEQ ID NO 499 se unen a HLA-B*07. Los péptidos de la Tabla 3 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos de la invención. En la Tabla 3, los péptidos con las SEQ ID N.º 384 a SEQ ID N.º 445 se unen a HLA-B*07.

Tabla 1a: Péptidos conformes a la presente invención.

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
1	RPRSLQCVSL	KLK2	B*07
2	VPGSDPARYEFL	MAGEA10	B*07
3	MPYVVLTA	SLC6A3	B*07
4	GPKKFIVKL	TGM4	B*07
5	LPSLSHCSSL	PRAME	B*07
6	LPLNSSTSL	MMP12	B*07
7	RPSQLAPATL	LOC100507003	B*07
8	MPKTNLSKM	LOC100507003	B*07
9	RPDSRLLEL	CTAG2	B*07
10	SPMEAELVRRIL	CTAG2	B*07
11	APLPRPGAV	CTAG2	B*07
12	LPNTGRIGQLL	TGM4	B*07
13	LPNTGRIGQL	TGM4	B*07
14	AVHEIGHSL	MMP12	B*07
15	KPGFNISIL	CYP4Z1, CYP4Z2P	B*07
16	FPAPPAHWF	CYP4Z1, CYP4Z2P	B*07

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
17	SPAAPLSPASSL	CRH	B*07
18	MALSVLRLAL	SPINK2	B*07
19	WPRLPGAGL	FAM178B	B*07
20	MVLGIGPVL	SLC45A3	B*07
21	APSRLLEL	LOC645382, LOC645399, PRAMEF10	B*07
22	LPQLKPAL	AMTN	B*07
23	VPRPTSTVGL	TRIM51, TRIM51BP, TRIM51EP, TRIM51HP	B*07
24	VPRPTSTVGLFL	TRIM51, TRIM51BP, TRIM51EP, TRIM51HP	B*07
25	RPQGAVGGL	RHOXF2, RHOXF2B	B*07
26	SPSFSSTLLSL	MAGEC1	B*07
27	RIRVTSEVL	ABCC11	B*07
28	LPAPTSVL	COL20A1	B*07
29	APLRVHITSL	PAEP	B*07
30	YPGFTKRL	ACTL8	B*07
31	RPGPSDPAA	KISS1R	B*07
32	APMAPGRSPL	PGR	B*07
33	LPRGLSPARQL	PGR	B*07
34	APMAPGRSP	PGR	B*07
35	APLPPPRAL	COL20A1	B*07
36	RPFSREMDL	FLT3	B*07
37	LPPPRALTL	COL20A1	B*07
38	RPSFPNLTSE	FLT3	B*07
39	QPRPSSEKI	POU4F1, POU4F2, POU4F3	B*07
40	FPRTVKHIDAAL	MMP1	B*07
41	MPAGGGPRSL	CKAP4	B*07
42	APLKMLAL	CCL17	B*07
43	APTPRPKVL	BMPR1B	B*07
44	SPSQTVQRAV	IGHE	B*07
45	TRPWSGPYIL	DCT	B*07
46	QPISGNPVTL	FCRL5	B*07
47	RPRQTGALM	DNTT	B*07
48	RPRYSIGL	BMPR1B	B*07
49	APEKARAFL	SOX14	B*07
50	PEKARAFL	SOX14	B*07
51	SPVFYVQTL	ABCC11	B*07
52	KEDNPSGHTYTL	MAGEB1	B*07
53	SPRIPFSTF	ROPN1	B*07
54	VPSCGRSVEGL	PTHLH	B*07
55	LPALLRSGL	RAPGEF5	B*07
56	LPALLRSGLTL	RAPGEF5	B*07

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
57	APLLPIRTL	UPK2	B*07
58	APLLPIRTLPL	UPK2	B*07
59	KPRTIYSSL	DLX1, DLX4, DLX6	B*07
60	RPYSIYPHGVTF	F5	B*07
61	LPRIPFSTF	ROPN1B	B*07
62	KPQSTISGL	F5	B*07
63	FPHMATTAF	HEPHL1	B*07
64	VPRPIFSQLYL	GREB1, GREB1L	B*07
65	FPNVYSTLV	SLC45A2	B*07
66	LPMTVISVL	NMUR2	B*07
67	VPVSRPVL	FCRL2, FCRL3, FCRL5	B*07
68	FPNEVSIVL	HMCN1	B*07
69	RPEDGRPRL	BTBD17	B*07
70	VPAQRLGLL	IGKV1D-43	B*07
71	APFAPLHGGGSL	NEFH	B*07
72	APCNGNVAV	KRT81	B*07
73	LPVSSPVTL	AKNAD1	B*07
74	VPVSHPV	FCRL3, FCRL5	B*07
75	HVRPQTNCI	DCC	B*07
76	KPKVESQAL	ABCC11	B*07
77	QPRLPGETL	FMN1, LOC101059984	B*07
78	HPSQESPTL	DLX5	B*07
79	GPASDHPSL	GREB1	B*07
80	SALPTTISF	MAGEA4	B*07/B*35
81	IAYPSLREAAL	MAGEA4	B*07/C*03
82	DAAHPGPSV	ALPPL2	B*07/B*51
83	AVSSHNNVI	POTEG	B*07
84	MPMQDIKMI	PRAME	B*07/B*51
85	MPMQDIKMILKM	PRAME	B*07/B*35
86	ALLLRGVTL	SLC6A3	B*07/C*06
87	APVGGNVTSSF	CT45A1, CT45A2, CT45A3, CT45A4, CT45A6, LOC101060208, LOC101060210, LOC101060211	B*07/B*35
88	KPSAVKDSIY	MMP26	B*07/A*26
89	FLIPRAGWLAGL	SLC45A3	B*07/C*06
90	HAIEKAFQL	MMP1	B*07/C*04
91	FPRLVGPdff	MMP11	B*07/B*35
92	TSPLPPTV	ENPP3	B*07
93	SVAIAHGvf	SLC35D3	B*07/B*15
94	LPMSKRQeY	DSCR6	B*07/B*35
95	RTKEEINEL	KRT121P, KRT81, KRT83, KRT85, KRT86	B*07/B*57
96	QPSLVQAIF	ANKRD28	B*07/B*35

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
97	LPPGTQIQI	ROBO3	B*07
98	FPCSALLACF	FAM107B	B*07/B*35
99	MPVSAFTVI	COL10A1	B*07/B*51
100	TPIPFDKILY	COL10A1	B*07/B*35
101	KPGLPGLK	COL10A1	B*07/C*07
102	MAGPAIHTAPM	DRAXIN	B*07
103	REPIMKADML	MAGEB1	B*07
104	RPLPNSVIHV	TFDP3	B*07
105	RPRYETGVCA	WISP3	B*07
106	APFHIDRLF	NMUR2	B*07
107	GQRLESPGGAA	SOX1	B*07
108	APRGSPPI	FCRL5	B*07
109	LPRALMRST	IGHE	B*07
110	YPSSPASAV	MAGEB17	B*07/B*51
111	YPLQQTNVY	SEMA5B	B*07/B*35
112	YPSPLNKHSF	SEMA5B	B*07/B*35
113	KPHLDRRGAVI	TSPY1, TSPY10, TSPY2, TSPY3, TSPY4, TSPY8	B*07
114	FVPPSGPSNPM	PAX3	B*07
115	KTKSLAQQI	LAMC2	B*07/A*30
116	RSYQHSLRL	LAMC2	B*07/C*07
117	IPHQRSSL	GCSAML	B*07
118	NPERHKPSF	C1orf186	B*07
119	KATEYVHSL	MYCN	B*07/C*16
120	TVRPKNAAL	MYCN	B*07
121	GPFQRAAL	MSX1	B*07
122	KPRTPFTTAQLL	MSX1	B*07
123	RPRLRDLPAL	RAPGEF5	B*07
124	KTIDGHINL	FAM111B	B*07/C*04
125	SPAKQFNIY	FAM111B	B*07/B*35
126	MPREDAHF	MLANA	B*07/B*35
127	KSKQVITLL	ENTHD1	B*07/C*02
128	SPPATLFLFLL	LOXL4	B*07
129	MTLPATTLTL	IGHE	B*07
130	GAYDKARYL	ABCC11	B*07/C*06
131	MPFRNIRSIL	LOC101060288, LOC101060295, LOC101060308, LOC645359, PRAMEF11, PRAMEF15, PRAMEF23, PRAMEF4, PRAMEF5, PRAMEF6, PRAMEF9	B*07
132	LPRLPVGSLV	EPYC	B*07/B*51
133	LPELPTTLTF	EPYC	B*07

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
134	VAAAARLTL	ITIH6	B*07
135	MPRLLRLSL	INSL6	B*07
136	QPDHAGIFRVF	HEPHL1	B*07
137	SPQLSYFEY	LAMC2	B*07/B*35
138	VPFNLITEY	SLC45A2	B*07/B*35
139	LVILQHQAM	NMUR2	B*07/A*26
140	TPFPDIHWF	HMCN1	B*07/B*35
141	YGPYGSWSGW	HRNR	B*07
142	HPFKMKWQY	QRFPR	B*07/B*35
143	YPMIPPAQL	BTBD17	B*07
144	RPVQGIPTY	HMCN1	B*07/B*35
145	VPAQRLGLLL	IGKV1D-43	B*07
146	SPTRGSEF	PTPRZ1	B*07
147	HVAQPAVVL	CTLA4	B*07/C*07
148	KPHLIYRQ	ADAMTS20	B*07
149	SPSSVFTSK	NAT1	B*07
150	APLHGGGSL	NEFH	B*07
151	QPTWNTQTRL	CLNK	B*07
152	SSASFSEELFRH	PTPRZ1	B*07
153	QPVHSLCSA	DPCR1	B*07/B*54
154	RPPPSRRAVL	BCAN	B*07
155	APIPRLIEG	CCDC38	B*07
156	GSRPVTGSV	KRT121P, KRT81, KRT83	B*07
157	RPVTGSVC	KRT121P, KRT81, KRT83	B*07
158	SVPVATVEL	ELL3	B*07/C*01
159	TPMTVPRI	KBTBD8	B*07/B*51
160	IPVSHPVLTf	FCRL3	B*07
161	ASKILETSL	HMCN1	B*07/C*03
162	IPIRVDQNGAF	ADAMTS6	B*07/B*35
163	FRYPNGVSL	RHBG	B*07/C*07
164	RAAGRRLQL	RHBG	B*07
165	RPSKEMQVTI	ONECUT3	B*07
166	YAYTSRVIL	KBTBD8	B*07/C*12
167	NVNPARKGL	DNMT3B	B*07
168	SPSGQRDVSL	ENTHD1	B*07
169	RPFSVSSISQL	HMCN1	B*07
170	APEGKRLGF	FMN1, LOC101059984	B*07
171	LPLGGHKSL	FMN1, LOC101059984	B*07
172	SAQSLHPVL	POU3F4	B*07/C*12
173	VIINNPISL	HMCN1	B*07/C*03
174	IPVTSSVTL	KRTAP24-1	B*07
175	AAFPHKIIF	SPINK13	B*07/C*12/C*02

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
176	QPLDICHSF	ETV4	B*07/B*35
177	VWEPQGSSRSL	DLX5	B*07
178	VPYYPRANL	STK31	B*07
179	PRVRLLLL	PTH2	B*07
180	RLRDYISSL	RALGPS2	B*07/C*07
181	LPVSPARAL	ADAM12	B*07
182	RPLVSPARAL	ADAM12	B*07
183	VPRRPARAL	BCAN	B*07
184	KIIASGNHL	ERVV-1, ERVV-2	B*07
185	RPVLTASSF	FCRL2	B*07
186	VPLPAGGGTVLT	GRP	B*07
187	APPPPPPPF	BEND4	B*07
188	HAAASFETL	FCRLA	B*07/B*35
189	QPQCSTHIL	APOB	B*07
190	RLAHVRARL	GREB1	B*07/C*07
191	KPKAVKPKAA	HIST1H1B	B*07
192	IPFADVKSF	ROS1	B*07
193	LPALKEEAF	NKX3-1	B*07/B*35
194	HPNKKIKASL	TRPS1	B*07
195	NPIFGRKEL	CAPN6	B*07
196	RPSGTAGAAL	EGFR	B*07
197	RPSGTAGAALLA	EGFR	B*07/B*56
198	LPSPAHAFRAL	SIGLEC15	B*07
199	SPFWIHQA	MPL	B*07
200	EPFHLIVSY	FCRLA	B*07/B*35
201	LPIARVLTV	LRP1B	B*07/B*51
202	SPSREASAL	MPL	B*07
203	KPRGPIDI	COL9A1	B*07
204	FPYSGDKILV	VCAN	B*07/B*51
205	LPPALLTTV	VCAN	B*07/B*51
206	TPRIGPKVSL	VCAN	B*07
207	VPSDITTAF	VCAN	B*07/B*35
208	RNRQVATAL	SUCNR1	B*07
209	KIEQIRAVL	LAMB3	B*07
210	IPENRVVSY	CCL24	B*07/B*35
211	IPDTIASVL	SLC24A5	B*07
212	VPYAAQAAL	SP5	B*07
213	RPYQDAPVA	SIGLEC8	B*07/B*55
214	LPLKFFPII	TMPRSS3	B*07
215	IPVAIKEL	EGFR	B*07
216	LPWEQNEQV	APOB	B*07/B*51
217	SPGDKRLAAYL	APOB	B*07

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
218	VQRTPPPI	USH1C	B*07
219	VPHTGRYTCL	HMCN1	B*07
220	RPAPGPAPFV	GRIN2D	B*07
221	LPQRPNARL	LAMB3	B*07
222	MLKTTLTAF	APOB	B*07
223	KAHVRIEL	RNF43, SUPT4H1	B*07/C*16
224	SPIIHSILL	PLEKHG4B	B*07
225	SPIIHSIL	PLEKHG4B	B*07
226	APGGSSRSSL	IGLL1	B*07
227	RPGTGQGGL	IGLL1	B*07
228	RPTAASQSRAL	IGLL1	B*07
229	FPNAGPRHLL	RALGPS2	B*07
230	DVIDDIISL	MITF	B*07/A*25
231	SPITLQAL	APOB	B*07
232	TAYPSLRLL	ST8SIA2	B*07/C*06
233	MAYDRFIAI	OR10V1, OR4K1, OR51B2, OR51B5, OR9K2	B*07/C*03
234	HPRAPGEQQRL	RNF43, SUPT4H1	B*07
235	AQNPA GTAL	HMCN1	B*07/B*15
236	TPELKSSIL	APOB	B*07
237	LPRAGGAF	LAMB3	B*07
238	LPRAGGAFLM	LAMB3	B*07
239	VLPRAGGAFLM	LAMB3	B*07
240	RVMLPKAAL	NLRP2	B*07
241	LPKAALLV	NLRP2	B*07/B*51
242	IPETASVVAI	FCRLA	B*07
243	MARTGGMVVI	UPK2	B*07
244	VPAHLVAA	ESM1	B*07/B*55
245	GPVPSPLAL	GDF7	B*07
246	RPILKEQSSSSF	KRT13, KRT16	B*07
247	SPVGVGQRL	SOX3	B*07
248	KPYDGIPAS	EGFR	B*07/B*56
249	SPRSGVLL	LGR5	B*07
250	APAAPAAVPS	FEZF1	B*07
251	MPVDSFNSM	NFE2L3	B*07/C*04
252	QPENSLEGISL	NFE2L3	B*07
253	MPVDSFNSML	NFE2L3	B*07
254	RVIQGT TTL	PHEX	B*07/A*32
255	VPSHWMVAL	CD79B	B*07
256	SPVPSHWMVAL	CD79B	B*07
257	APYGTLRKS	SYT12	B*07
258	SVIGPNSRL	BTLA	B*07/A*26

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
259	VPMPGVQAV	TMEM211	B*07
260	LVQSSRSEV	KRT16	B*07
261	SPSTSRTPL	EGFR	B*07
262	SPSTSRTPLLSSL	EGFR	B*07
263	SQRPPATSQA	HTR3A	B*07
264	APRPGNWIL	LAMA1	B*07
265	FPRKPYEGRV	LOXL3	B*07
266	KPYEGRVEI	LOXL3	B*07
267	MPVPGILL	PMEL	B*07
268	EPLSVTASY		B*07/A*25
269	FTVSSSSAM	LOC100131514, LOC101060622, MUC3A	B*07/C*03
270	SPRGTTSTL		B*07
271	SPTPVFTTL	LOC100131514, LOC101060622, LOC101060740, LOC101060797, MUC3A, MUC3B	B*07
272	SSPRGTTSTL		B*07
273	TDTPSTTPTTI	MUC3A	B*07
274	KPIRTGISPLAL	APOB	B*07
275	IPAPQGAVL	KISS1	B*07
276	RPVWDVRS	RNASE10	B*07/B*55
277	MPPLLIVAF	HCAR1	B*07/B*35
278	LIAARGSLVL	NTN3	B*07
279	APADEPRTVL	SAPCD2	B*07
280	LPRAFLQSL	SAPCD2	B*07
281	NPRSPPATM	SIGLEC15	B*07
282	AVRLPTPNL	MPL	B*07
283	RPQPGWRESL	FMR1NB	B*07
284	RPSAPRGPP	ASCL2	B*07
285	RITWKGLLL	PSG3, PSG8, PSG9	B*07/C*07
286	APARPAAAF	TDRD9	B*07
287	SPIPRPLFL	SYCP2	B*07
288	LHAMNSLSAM	DMBX1	B*07
289	LPYEKVSRL	CHST4	B*07
290	RPTHPLRSF	DCC	B*07
291	SPSKSLEM	L1TD1	B*07
292	LPMTHRLQL	PSG4, PSG5, PSG6, PSG7	B*07
293	FPYDKPLIM	MET	B*07/B*51
294	VPKPAIPSSSVL	DCC	B*07
295	HPRWIEPTVM	HOXA13	B*07
296	SPLLMQRTL	TFEC	B*07/B*51
297	FPIKYVNDP	MET	B*07/B*35
298	RVLLRWISL	ILDR2	B*07

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
299	SPFSGGPVSF	POU5F1, POU5F1B	B*07
300	HPYSDLADVF	RTL1	B*07
301	FPAFLEAM	RTL1	B*07/B*35
302	IPIDQILNSF	RTL1	B*07/B*35
303	RPPPPCIAL	RTL1	B*07
304	SPLIGDFPAF	RTL1	B*07/B*35
305	AASPVGSAL	SLC16A11	B*07/C*03
306	RPFPLALL	CYP2W1	B*07
307	RPHQKGWLSI	KLB	B*07
308	RPDVVRTLL	ARSI	B*07
309	FAFYGGKSL	SLC44A5	B*07/C*03
310	SPGWAQTQL	MACC1	B*07
311	APRLALDPDAL	AMH	B*07
312	SPSLQSSRESL	KIF26B	B*07
313	VPLSSYVSI	PCDHGA11	B*07
314	IALMKLAGPL	TMPRSS3	B*07
315	APVVFPAL	GSC	B*07
316	NPREPEKSL	LOC100124692	B*07
317	MPYNSAHHCVV	KLHL14	B*07/B*51
318	TPISNTGVL	SIGLEC6	B*07
319	RPLDTFRVL	EVX1	B*07
320	APMHIDRNIL	SLC10A5	B*07
321	QPQQPGFFL	MED12L	B*07
322	RAVPVGSGL	TRIT1	B*07/C*03
323	TPHGITDIL	NKX6-3	B*07
324	LPAPLRISL	GPR45	B*07
325	SPRSNPVRL	FCRL4	B*07
326	IPPFTQRVF	RASSF9	B*07/B*35
327	GPRTTQSSVL	SIGLEC6	B*07
328	LPLHRGDLVI	DNMBP	B*07/B*51
329	QPANFIVLL	LOC100124692	B*07
330	RPFSAIAEL	MORC4	B*07
331	SPDSAILKL	ZNF827	B*07
332	SPYAGSTAF	IRX5	B*07
333	SVLPRALSL	C5orf34	B*07/C*07
334	YPLSLALHF	C5orf34	B*07/B*35
335	VPPQNPRPSL	RUNX2	B*07
336	YPLQGPGLLSV	NUP155	B*07/B*51
337	IPTSRVITL	NUGGC	B*07
338	MPATPSLKV	TRIM15	B*07
339	GPQRTTSV	DTX1	B*07
340	APEPRAALL	UAP1L1	B*07

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)	Alotipo HLA
341	LPRSPPLKVL	RMI2	B*07
342	RPRPPKVL	TXNRD1	B*07
343	RPRPPKVLGL	TXNRD1	B*07
344	VPYPSPTCV	AR	B*07
345	SAAPPGASL	AR	B*07/C*03
346	IPMPRITWL	FSTL4	B*07
347	SPLEKINSF	BRIP1	B*07
348	HPAPPVTS	STON2	B*07/B*54
349	QPRDGWPMML	STON2	B*07
350	RPKSTLMNF	STON2	B*07
351	SPYADIIPSA	GLI3	B*07/B*54
352	LPAFSKIGGIL	IQGAP3	B*07
353	KPRATWTL	RTP4	B*07
354	APAKDARASL	TRIO	B*07
355	APKTSFIAA	GALNT5	B*07/B*55
356	RPFLRLPSL	UCHL3	B*07
357	LPPHIFAI	MYO10	B*07/B*51

Tabla 1b: Péptidos conformes a la presente invención.

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)
448	TVYGEPRKL	MAGEA4
449	RPKTSVNLISL	MMP12
450	SAAARALLP	MMP11
451	VPILPLNHAL	PGR
452	QPVKKNTL	ENPP3
453	APALPGQVTI	MEX3A
454	SPDPAHLESL	MAGEA8
455	FPVQATIDF	DSCR6
456	VPVSHPVLT	FCRL5
457	RPPLSQRHTF	CLNK
458	VPIPTHYFVVL	ENPP3,OR2A4
459	SPAPWRPWI	DSCR6
460	APLMPLGKTL	LAMC2
461	MPHLGPGILL	ITIH6
462	MPLLADVRL	ITIH6
463	LPTDLFNSVM	ROPN1,ROPN1B
464	VPFVPRTSV	NFE2L3
465	VPKSLPYVL	GTSF1

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen(es)
466	SPMEAILVSRL	MAP7D2
467	VPRNQDWLGVSRQL	PMEL
468	LPSLHVLVL	DCT
469	LPLDTRTSI	CLNK
470	RPNGEVKSEL	GRM8
471	LPLLAGTLLL	ALPI,ALPP,ALPPL2
472	LPMPAITWY	HMCN1
473	LPGEREAAL	FMN1,LOC101059984
474	VPKADLLTL	FMN1,LOC101059984
475	IPLEIQKL	CDRT1,FBXW10
476	EPNPVEEIF	COL11A1
477	NPVPVITWYKDNRL	HMCN1
478	APKFISPASQL	GRM8
479	APHAGGALL	MIXL1
480	VPAAPTKAL	SPOCD1
481	SPARALLLALA	ADAM12
482	QPSLKKIIL	INSL4
483	KPAAAGVKKVA	HIST1H1B
484	LPASAEPKGTMT	OFCC1
485	LPLKTKVFA	ZPLD1
486	TPTRPLPSA	USH1C
487	IPWFIKTAF	SLC24A5
488	LPLGGLPLLI	BTLA
489	WPNHIMLVL	GREB1,GREB1L
490	APRGPAQGEAA	RUNX1
491	MPEADLKRIF	SLC24A5
492	IPFSVDEI	NFE2L3
493	LPLQYKLV	FEZF1
494	LPLRAVNLNL	FAM64A
495	SPSYTQASL	TRPS1
496	MPAVSGPGPLF	LMAN1L
497	YVVKPLHPF	ROS1

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

SEQ ID N.º	Secuencia	Símbolo(s) oficial(es) del gen
358	APSMRLRKNQL	DCAF4L2
359	SPRRLVELAGQSL	PRAME
360	SPASRSISLL	CD70

SEQ ID N.º	Secuencia	Símbolo(s) oficial(es) del gen
361	SPYGSDRLVQL	ZBTB32
362	KPMLPPAAF	MSX1
363	KPRTPFETTA	MSX1
364	KPRTPFETTAQL	MSX1
365	RPKHFLQML	NLRP7
366	SPTLRQLDL	NLRP11
367	APQVHIFSL	OXTR
368	NPASRLTAL	BMPR1A, BMPR1B
369	RPYGCVLRAA	CD70
370	AAHEFGHVL	MMP11
371	APRSPGQVTPRGL	C6orf223
372	SPSSASLTL	FAM227B
373	LPKPDLPQLI	DEFB132
374	KPRNMTGLDL	CLEC17A
375	LPRGVLEGL	SAPCD2
376	FPQVGRTAL	CXCR3
377	SPFSKRIKL	BCL11A
378	SPRQPRLDF	E2F7
379	GPRQVLFPL	PCDHGB6, PCDHGB7
380	SPYPGSAAF	IRX2
381	APRPRLLLL	TGFBR1
382	RPGPQRTTSV	DTX1
383	KPRATWTLKL	RTP4

Tabla 2b: Péptidos adicionales acordes con la presente invención sin vinculación previa conocida con el cáncer.

SEQ ID N.º	Secuencia	Símbolo(s) oficial(es) del gen
498	RPQPQPRPAL	WNT10A
499	QPVLPSPAC	PMEL

Tabla 3: Péptidos de la presente invención que son útiles, entre otros usos, para terapias personalizadas contra el cáncer.

SEQ ID N.º	Secuencia	Símbolo(s) oficial(es) del gen
384	APLLLARAA	ACPP
385	FPSLREAAL	MAGEA1
386	YPLRGSSI	ALPP, ALPPL2
387	MPMQDIKM	PRAME
388	SPSVSQLSVL	PRAME
389	APLPRPGAVL	CTAG2
390	SPRMSGLLSQT	DLL3

SEQ ID N.º	Secuencia	Símbolo(s) oficial(es) del gen
391	APRPASSL	MMP11
392	GPQPWHAAL	MMP11
393	APAAWLRSA	MMP11
394	APAAWLRSAA	MMP11
395	APAAWLRSAAA	MMP11
396	VPDVAQFVL	MMP1
397	GPALGRSFL	CD70
398	SPASRSISL	CD70
399	NPFYPEVEL	MMP1
400	TIASQRLTPL	CD70
401	RPAPADSAL	KISS1R
402	LPSPVDAAF	MMP11
403	RGVPSEIDAAF	MMP11
404	VPSEIDAAF	MMP11
405	LPFDGPGGIL	MMP11
406	LPDGSRVEL	ACTL8
407	FPRLVGPDF	MMP11
408	YPKDIYSSF	MMP1
409	IPASHPVL	FCRL5
410	SPRSWIQVQI	FCRL5
411	IPNWARQDL	NLRP7
412	HPSAHDVIL	LAMC2
413	SVHKITSTF	LAMC2
414	KPSESIYSAL	FAM111B
415	LPSDSHFKITF	FAM111B
416	RAKNAGVTI	LAMC2
417	VPRPIFS QL	GREB1, GREB1L
418	RPMTPTQIGPSL	TCL1A
419	SPMWHVQQQL	QRFR
420	SPRWLPVSL	BTBD17
421	FPTEVTPHAF	PTPRZ1
422	IPVSHPVL	FCRL3
423	SPRVYWLGL	CLEC17A
424	YPRGNHWAVGH	GRP
425	YPRGNHWAVGHL	GRP
426	RYLPNPSLNAF	CYP1A1
427	VPSSRILQL	THEG
428	SPADAHRLNL	NLRP2
429	RPRALRDLQL	NLRP7
430	RPRALRDLQLL	NLRP7
431	VPLPAGGGTV	GRP
432	VPLPAGGGTVL	GRP
433	IPEPSAQQL	APOB

SEQ ID N.º	Secuencia	Símbolo(s) oficial(es) del gen
434	LPRIPFADV	ROS1
435	MPLSTIREV	CDK6
436	RPMQQARAQL	KLHDC7B
437	FPYPYAERL	GRIN2D
438	LPRAGGAFL	LAMB3
439	NPFPHLITL	ROS1
440	YPRITIPGM	KLK14
441	SPVPSHWMVA	CD79B
442	SPSTSRTPLL	EGFR
443	VPDGVSKVL	APOB
444	RVEEVRALL	CDKN2A
445	RPAATAVISL	SLC7A11

La presente invención, además, se refiere en general a los péptidos acordes con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, como por ejemplo, leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

Se prefieren especialmente los péptidos –solos o en combinación– conformes con la presente invención seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID 383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499. Se prefieren ante todo los péptidos –solos o en combinación– seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 79 (véase la Tabla 1a), y sus usos en la inmunoterapia del cáncer, y preferentemente de la leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de

pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los péptidos acordes con la presente invención para el tratamiento –preferentemente combinado– de una enfermedad proliferativa seleccionada entre las del grupo formado por leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

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

La presente invención se refiere, además, a péptidos acordes con la presente invención en que cada uno de dichos péptidos consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499.

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, 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 1 a SEQ ID N.º383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, preferiblemente la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º79, o una variante de dichas secuencias de aminoácidos.

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

En un aspecto, los linfocitos T activados pueden ser producidos poniendo en contacto en condiciones in vitro linfocitos T con moléculas MHC de clase I o II humanas cargadas con el antígeno y presentadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno

adecuada o de un constructo artificial que emule tal célula durante un período de tiempo suficiente para activar dichos linfocitos T.

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, a un método para tratar a un paciente que padece cáncer, cuyas células cancerosas expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos conforme 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, a un método para desencadenar una respuesta inmunitaria en un paciente que padece cáncer, cuyas células cancerosas expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos conforme a la presente invención, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T producidos conforme a la presente invención.

En un aspecto, la respuesta inmunitaria puede incluir una respuesta de linfocitos T citotóxicos.

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

MHC acordes con la presente invención. Preferiblemente, dicho medicamento es activo contra el cáncer.

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

La presente invención, además, se refiere a un uso acorde con la presente invención, en que dichas células cancerosas son células de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y endometrio, y preferiblemente leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y endometrio.

La presente invención se refiere, además, a biomarcadores basados en los péptidos acordes con la presente invención, aquí denominados «dianas» que pueden ser utilizados en el diagnóstico del cáncer, preferentemente de la leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer

de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y endometrio. 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.

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 significativo en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. En particular, los linfocitos T CD8-positivos, 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 significativo papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Tal y como se usan aquí, y a menos que se indique de otra manera, todos los términos se definen tal y como se indica más abajo.

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 o 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 epítipo o epítipos 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 epítipos 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 «epítipo» 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 4: Frecuencias de expresión de los serotipos HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 y HLA-B*44. Las frecuencias haplotípicas (G_f) derivan de un estudio que usó los datos de tipado de HLA procedentes de un registro con más de 6,5 millones de donantes voluntarios de EE. UU. (Gragert et al., 2013). La frecuencia haplotípica es la frecuencia de un alelo dado en un cromosoma individual. Debido a la dotación cromosómica diploide propia de las células de mamífero, la frecuencia genotípica de este alelo es superior y se calcula empleando la ley de Hardy-Weinberg ($F = 1 - (1 - G_f)^2$).

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica (F)
A*02	Africana (N=28.557)	32,3%
	Caucásica europea (N=1.242.890)	49,3%
	Japonesa (N=24.582)	42,7%
	Hispana, América Central y del Sur (N=146.714)	46,1%
	Sudeste asiático (N=27.978)	30,4%
A*01	Africana (N=28.557)	10,2%
	Caucásica europea (N=1.242.890)	30,2%
	Japonesa (N=24.582)	1,8%
	Hispana, América Central y del Sur (N=146.714)	14,0%
	Sudeste asiático (N=27.978)	21,0%
A*03	Africana (N=28.557)	14,8%
	Caucásica europea (N=1.242.890)	26,4%
	Japonesa (N=24.582)	1,8%
	Hispana, América Central y del Sur (N=146.714)	14,4%
	Sudeste asiático (N=27.978)	10,6%

A*24	Africana (N=28.557)	2,0%
	Caucásica europea (N=1.242.890)	8,6%
	Japonesa (N=24.582)	35,5%
	Hispana, América Central y del Sur (N=146.714)	13,6%
	Sudeste asiático (N=27.978)	16,9%
B*07	Africana (N=28.557)	14,7%
	Caucásica europea (N=1.242.890)	25,0%
	Japonesa (N=24.582)	11,4%
	Hispana, América Central y del Sur (N=146.714)	12,2%
	Sudeste asiático (N=27.978)	10,4%
B*08	Africana (N=28.557)	6,0%
	Caucásica europea (N=1.242.890)	21,6%
	Japonesa (N=24.582)	1,0%
	Hispana, América Central y del Sur (N=146.714)	7,6%
	Sudeste asiático (N=27.978)	6,2%
B*44	Africana (N=28.557)	10,6%
	Caucásica europea (N=1.242.890)	26,9%
	Japonesa (N=24.582)	13,0%
	Hispana, América Central y del Sur (N=146.714)	18,2%
	Sudeste asiático (N=27.978)	13,1%

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 B*07. 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 positivos para B*07, 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 B*07 de la invención con péptidos que se unen a otro alelo, por ejemplo, el A*24, tiene la ventaja de que se puede tratar a un porcentaje mayor de cualquier población de pacientes que si ésta solo se dirigiera contra un único alelo MHC de la clase I. Mientras que en la mayoría de poblaciones solo se podría tratar a menos del 50% si se optara por uno solo de los alelos, una vacuna que comprenda epítomos

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).

Tabla 5: Cobertura de los alelos del HLA en la población caucásica europea (calculada a partir de (Gragert et al., 2013))

	Cobertura (al menos un alelo A)	combinado con B*07	combinado con B*44	combinado con B*07 y B*44
A*02 / A*01	70%	78%	78%	84%
A*02 / A*03	68%	76%	76%	83%
A*02 / A*24	61%	71%	71%	80%
A*01 / A*03	52%	64%	65%	75%
A*01 / A*24	44%	58%	59%	71%
A*03 / A*24	40%	55%	56%	69%
A*02 / A*01 / A*03	84%	88%	88%	91%
A*02 / A*01 / A*24	79%	84%	84%	89%
A*02 / A*03 / A*24	77%	82%	83%	88%
A*01 / A*03 / A*24	63%	72%	73%	81%
A*02 / A*01 / A*03 / A*24	90%	92%	93%	95%

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

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

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

$$\text{Identidad porcentual} = 100 [1 - (C/R)]$$

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 una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 226 y las SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499 o una variante de las mismas que es un 88% homóloga a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, o una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido. Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o, en el caso de las versiones alargadas de dichos péptidos, a una molécula de la clase II.

En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas.

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

Por «variante» de la secuencia de aminoácidos dada, los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicadas en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de linfocitos T activados.

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía y de las bases de datos científicas, ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión. Así pues, una persona versada en la técnica será capaz de modificar las secuencias de aminoácidos expuestos en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, 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).

En un aspecto, las sustituciones conservadoras pueden incluir aquellas que son descritas por Dayhoff en "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research, el contenido del cual se incorpora íntegramente como referencia. Por ejemplo, en un aspecto, los aminoácidos, que pertenecen a uno de los grupos siguientes, pueden cambiarse entre sí, lo cual constituye un intercambio conservador: Grupo 1: alanina (A), prolina (P), glicina (G), asparragina (N), serina (S), treonina (T); Grupo 2: cisteína (C), serina (S), tirosina (Y) y treonina (T); Grupo 3: valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), alanina (A) y fenilalanina (F); Grupo 4: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); Grupo 5: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W) e histidina (H); y Grupo 6: ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). En un aspecto, se puede seleccionar una sustitución

conservadora de un aminoácido entre las siguientes: T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G y/o T→S.

En un aspecto, la sustitución conservadora de aminoácidos puede incluir la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, por ejemplo: (1) no polar: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) polar sin carga: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) ácido: Asp, Glu; y (4) básico: Lys, Arg, His. Otras sustituciones conservadoras de aminoácidos también se pueden hacer del modo siguiente: (1) aromáticos: Phe, Tyr, His; (2) donante de protones: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; y (3) aceptor de protones: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 10.106.805, cuyo contenido se incorpora íntegramente a modo de referencia).

En otro aspecto, las sustituciones conservadoras se pueden hacer de acuerdo con la Tabla A. Y se pueden hallar métodos para predecir la tolerancia a la modificación de proteínas en, por ejemplo, Guo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101(25):9205-9210 (2004), cuyo contenido se incorpora íntegramente a modo de referencia.

Tabla A

Sustituciones conservadoras de aminoácidos	
Aminoácido	Sustituciones (otras son conocidas en la técnica)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

En otro aspecto, las sustituciones conservadoras pueden ser aquellas mostradas en la Tabla B con el encabezado de “sustituciones conservadoras”. Si tales sustituciones derivan en un cambio de la actividad biológica, entonces, si es necesario, se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados en la Tabla B “sustituciones de ejemplo”, y los productos se pueden cribar en busca de los deseados.

Tabla B

Sustituciones de aminoácidos		
Residuo original (aminoácidos presentes de forma natural)	Sustituciones conservadoras	Sustituciones de ejemplo
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

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, aun 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

otro aminoácido 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.

Los más preferidos son los péptidos consistentes en las secuencias indicadas.

Tabla 6: Variantes y motivo de los péptidos acordes con la SEQ ID N.º 13, 25, 38, 54 y 362.

[illegible]

										V	
										M	
										A	
										I	
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Seq ID No 54	V	P	S	C	G	R	S	V	E	G	L
Variante											F
											V
											M
											A
											I
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Seq ID No 362	K	P	M	L	P	P	A	A	F		
Variante									L		
									V		
									M		
									A		
									I		

También pueden ser adecuados péptidos más largos (alargados). También es posible que los epítomos 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 epítomo real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítomo de interés sean residuos que no afecten sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epítomo durante el procesamiento.

Los péptidos de la invención se pueden alargar hasta cuatro aminoácidos, es decir, se pueden añadir 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en cualquier combinación entre 4:0 y 0:4. A

continuación en la Tabla 7 se exponen combinaciones de las elongaciones conformes a la invención:

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

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

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

Así pues, los epítomos de la presente invención pueden ser idénticos a los epítomos específicos de tumor o asociados a tumor naturales o pueden incluir epítomos 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 proporciona péptidos y variantes de epítomos de MHC de clase I, en los que el péptido o variante tiene una longitud total entre 8 y 100, preferentemente entre 8 y 30, y, más preferentemente aún entre 8 y 14, esto es 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14 aminoácidos, que en el caso de los péptidos alargados 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 μ M, 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 las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499.

«Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y la SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499 o una variante de las mismas 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 epítipo para el epítipo 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 «li») 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, de forma que vayan dirigidos específicamente por dicho anticuerpo, o, por ejemplo, con un anticuerpo que es específico para las células dendríticas tal y como se describe en la presente memoria.

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

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

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH₂-NH, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. La patente de EE. UU. 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH₂-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la

síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH_3 .

Péptidos que comprenden las secuencias descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrofóbicos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej., el grupo hidrofóbico t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

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

De manera similar, un péptido o variante de la invención puede ser modificado químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. carcinoma colorrectal Press, 2004 (Lundblad, 2004), que se incorpora en la presente memoria como referencia. La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido perfórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros

mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

En resumen, la modificación de p. ej., los residuos arginilo de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilgloxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilgloxal 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 consumir con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.

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

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

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

Otra forma de realización de la presente invención se refiere a un péptido no presente en la naturaleza en que dicho péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499 y ha sido producida sintéticamente (p. ej. sintetizada) en forma de una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los métodos para la síntesis de péptidos son bien conocidos en la materia. Las sales de los péptidos conformes a la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en las condiciones *in vivo*. De la forma artificial de sal del péptido depende su solubilidad, en particular en el contexto de composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos, como, por ejemplo, las vacunas peptídicas que se dan a conocer en la presente memoria. Para que los péptidos se puedan suministrar de modo eficaz al sujeto a tratar, es preciso que el péptido o péptidos tengan la suficiente solubilidad, por lo menos sustancial. Preferiblemente, las

sales de los péptidos deben ser sales farmacéuticamente aceptables. Estas sales conformes a la invención incluyen sales alcalinas y alcalinotérreas como las sales de la serie de Hofmeister que comprenden aniones como PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- y cationes como NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Ba^{2+} . En concreto, las sales se seleccionan entre las siguientes: $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 y $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. En particular se prefieren el NH acetato, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl y CaCl_2 , como, por ejemplo, las sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato).

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

En un aspecto, el polipéptido descrito en la presente memoria adquiere la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, el polipéptido que adopta la forma de una sal farmacéutica se halla en forma cristalina.

En un aspecto, la sal farmacéuticamente aceptable descrita en la presente memoria se refiere a sales cuyo perfil de toxicidad queda dentro de márgenes aceptables para las aplicaciones farmacéuticas.

En un aspecto, las sales farmacéuticamente aceptables pueden aumentar la solubilidad y/o la estabilidad de los péptidos descritos en la presente memoria. En otro aspecto, las sales farmacéuticamente aceptables descritas en la presente memoria pueden ser preparadas con medios convencionales a partir del correspondiente complejo o del péptido portador mediante la reacción por ejemplo, del ácido o de la base apropiados con los péptidos o complejos tal y como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, las sales farmacéuticamente aceptables están presentes en forma cristalina o semicristalina.

En otro aspecto más, las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, las descritas en Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use By P. H. Stahl and C. G. Wermuth (Wiley-VCH 2002) and L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, in "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology". Eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, pp. 453-499, referencias bibliográficas todas ellas que se incorporan íntegramente a la presente memoria como referencia.

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-fluorenilmetiloxycarbonilo (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 butiloxycarbonílicos (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'-dimetoxibenzhidrido 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), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo (Bruckdorfer et al., 2004) y las referencias citadas en la misma).

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

La purificación puede llevarse a cabo mediante 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 sobrerepresentados se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación mediana de la muestra, así como la variación de los duplicados. El perfil superpone 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 sobrerepresentación calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (Pinheiro et al., 2015) ajustando para el análisis múltiple con la Tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*) (Benjamini and Hochberg, 1995) (véase Ejemplo 1, Figuras 1A-1I).

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 péptidos asociados a tumor naturales (TUMAP) recogidos de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer

de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio (N = 149 muestras) con los patrones de fragmentación de otros tantos péptidos sintéticos de referencia cuyas secuencias eran idénticas. Como los péptidos han sido identificados directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados constituyen una prueba directa de que los péptidos identificados son objeto de un procesamiento y de una presentación naturales en el tejido tumoral primario obtenido de 149 pacientes aquejados de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria, cáncer de útero y de endometrio.

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 sobrerepresentados en función de la cuantificación relativa de los niveles de péptidos restringidos a HLA en tejidos cancerosos respecto a diversos tejidos y órganos normales. Ello se consiguió mediante el desarrollo de la cuantificación diferencial sin marcador con los datos adquiridos de CL-EM procesados con una plataforma de análisis de datos patentada que combina algoritmos para la identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

Se calcularon los niveles de presentación incluyendo estimaciones de error para cada péptido y cada muestra. Así se han identificado aquellos péptidos que aparecen presentados exclusivamente o bien aparecen sobrerepresentados en el tejido tumoral con respecto a los tejidos y órganos no cancerosos. 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 sobrerepresentados en tejido tumoral respecto a los tejidos y órganos no cancerosos.

Primero se purificaron los complejos HLA-péptido derivados de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón(incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio, y a continuación se procedió a aislar y analizar mediante CL-EM los péptidos asociados a HLA (véase el ejemplo 1). Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón(incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio. De ese modo quedó confirmada su presentación en esos mismos tipos de cáncer, a saber: leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria, cáncer de útero y de endometrio.

Con los datos de recuento iónico suministrados por la CL-EM sin marcaje se cuantificaron los TUMAP identificados en múltiples muestras de tejidos normales y tejidos tumorales, a saber: leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio. El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Todas las señales cuantitativas producidas por cada péptido en varios experimentos de CL-EM se normalizaron con medidas de tendencia central, se promediaron por muestra y se combinaron en un diagrama de barras, llamado perfil de presentación. El perfil de presentación combina diversos métodos de análisis como la búsqueda en bases de datos de proteínas, agrupación de espectros, deconvolución del estado de carga (descarga) y alineamiento del tiempo de retención y normalización.

Aparte de la sobrerepresentación del péptido, se ha analizado la expresión del ARNm del gen originario. Los datos del ARNm se obtuvieron mediante análisis RNASeq de tejidos normales y tejidos cancerosos (véase el Ejemplo 2, Figuras 2A-2T). Otra fuente más de datos de tejidos normales consistió en una base de datos de expresión de ARN de acceso público, creada con unas 3000 muestras de tejido normal (Lonsdale, 2013). En la presente invención se incluyeron preferentemente péptidos derivados de las proteínas cuyo ARNm se expresa con profusión en el tejido canceroso, pero muy poco o nada en tejidos normales vitales.

La presente invención proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento de cánceres/tumores que sobrerepresentan o presentan exclusivamente los péptidos de la invención, preferentemente: leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar,

glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio. Con técnicas de espectrometría de masas se ha demostrado la presentación natural por moléculas HLA de estos péptidos en muestras humanas de tumores primarios de los tipos siguientes: leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

Se ha demostrado que muchos de los genes o proteínas originarios (también denominadas «proteínas enteras» o «proteínas subyacentes») de los que derivan los péptidos aparecen notablemente sobreexpresados en los tejidos cancerosos con respecto a los tejidos normales –en relación con la presente invención «tejidos normales» significa que son células sanas de sangre, vasos sanguíneos, cerebro, corazón, hígado, pulmón, glándula suprarrenal, vía biliar, vejiga, médula ósea, esófago, vesícula biliar, intestino grueso, intestino delgado, riñón, ganglio linfático, nervio periférico, páncreas, hipófisis, piel, médula espinal, bazo, estómago, tiroides, tráquea o células de otros tejidos normales, lo cual demuestra el alto grado de relación de los genes originarios con el tumor (véase el Ejemplo 2). Además, los péptidos en sí están fuertemente sobrerepresentados en el tejido tumoral –en relación con la presente invención se entiende por «tejido tumoral» una muestra extraída a un paciente aquejado de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no

hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio, pero no la procedente de tejidos normales (véase el Ejemplo 1).

Los péptidos unidos a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej., células de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria o cáncer de útero y de endometrio que presentan los péptidos derivados.

Los péptidos de la presente invención han demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están sobrepresentados y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención (véanse el Ejemplo 3 y el Ejemplo 4). Asimismo, cuando los péptidos están formando un complejo con el MHC correspondiente pueden ser utilizados también para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención. Los métodos pertinentes son conocidos por los expertos y también se pueden hallar en la bibliografía pertinente (véase también más adelante). Así pues, los péptidos de la presente invención son útiles para generar en un paciente una respuesta inmunitaria con la que destruir células tumorales. La respuesta inmunitaria se puede inducir en el paciente con la administración directa de los péptidos descritos o de sustancias precursoras adecuadas (p. ej., péptidos alargados, proteínas o ácidos nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante). Cabe esperar que la respuesta

inmunitaria generada por esa vacunación terapéutica sea muy específica contra las células tumorales porque los tejidos normales no contienen los péptidos diana de la presente invención en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

La presente descripción también se refiere a los receptores de los linfocitos T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta («TCR alfa/beta»). También se proporcionan péptidos acordes con la invención capaces de unirse a los TCR y anticuerpos cuando están presentados por una molécula de MHC.

La presente descripción se refiere, además, a fragmentos de los TCR acordes con la invención que son capaces de unirse a un antígeno peptídico acorde con la presente invención cuando son presentados por una molécula del HLA. El término se refiere en particular a fragmentos de TCR solubles, por ejemplo, TCR desprovistos de partes del dominio transmembrana y/o de regiones constantes, TCR monocatenarios, y fusiones de los anteriores, por ejemplo, con Ig.

La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células huésped para la expresión de TCR y péptidos de la presente descripción; y métodos para la utilización de los mismos.

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

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

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

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

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

Los TCR de la presente descripción se unen preferiblemente a un complejo de péptido-molécula de HLA con una afinidad de unión (KD) de aproximadamente 100 μ M o menos, aproximadamente 50 μ M o menos, aproximadamente 25 μ M o menos, o

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

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

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

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

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

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

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

En una realización, un TCR que comprende al menos una mutación en la cadena alfa del TCR y/o la cadena beta del TCR tiene una afinidad de unión a, y/o una semivida de unión a, un complejo de péptido-molécula de HLA, que es por lo menos el doble de la de un TCR que comprende una cadena alfa no mutada del TCR y/o una cadena beta no mutada del TCR. El aumento de la afinidad de los TCR específicos de tumores, y su aprovechamiento, se basa en la existencia de un intervalo de afinidades óptimas del TCR. La existencia de dicho intervalo se basa en observaciones que indican que los TCR específicos para los patógenos restringidos por HLA-B*07 tienen valores de KD que son aproximadamente 10 veces menores que los de los TCR específicos para autoantígenos asociados a tumores restringidos por HLA-B*07. En la actualidad se sabe que, aunque los antígenos tumorales pueden ser inmunogénicos, debido a que los tumores se desarrollan a partir de las propias células del individuo, sólo las proteínas mutadas o que porten alteraciones debidas a procesamiento traduccional serán reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario. Los antígenos que están regulados al alza o sobreexpresados (los llamados autoantígenos) no inducirán necesariamente una respuesta inmunitaria funcional contra el tumor: los linfocitos T que expresan TCR que son muy reactivos contra estos antígenos habrán sido seleccionados negativamente en el interior del timo en un proceso conocido como tolerancia central, lo que significa que

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

La presente descripción se refiere también a un método para la identificación y el aislamiento de un TCR según la presente descripción, en el que dicho método comprende la incubación de PBMC procedentes de donantes sanos HLA-B*07-negativos con monómeros de B*07/péptido, la incubación de las PBMC con los tetrámeros conjugados con ficoeritrina (PE), y el aislamiento de los linfocitos T de elevada afinidad mediante análisis y selección de células activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

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

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

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

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

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

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

Para obtener un elevado nivel de expresión superficial de TCR es necesario que ambas cadenas TCR-alfa y TCR-beta del TCR introducidos se transcriban a niveles elevados. Con este fin, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción pueden clonarse en constructos bicistrónicos en un solo vector, una estrategia que ha

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

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

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

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

humanos con sus dominios equivalentes en ratones (dominio C-terminal «murinizado»); la generación de un segundo enlace disulfuro entre las cadenas en el dominio C-terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína en ambas cadenas TCR-alfa y TCR-beta del TCR introducido (modificación de cisteínas); el intercambio de los residuos que interaccionan en los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta («saliente en hueco», *knob-in-hole*); y la fusión de los dominios variables de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta directamente con CD3 ζ (fusión con CD3 ζ) (Schmitt et al. 2009).

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

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

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba).

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

propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se lleva a cabo 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 de 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

epítomos 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 epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítomos 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 las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

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

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

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

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

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

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

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es

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

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

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

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

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o el del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene

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

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

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

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

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véanse por ejemplo Cohen y cols. (Cohen et al., 1972) y (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman y cols. (Sherman et al., 1986). El método de Beggs (Beggs, 1978) también resulta útil aún. 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 epítipo 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 Ribí, 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 immunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, inhibidores de puntos de control inmunitarios como ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab y cemiplimab, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimús, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema

inmunitario (p. ej., anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, interferón-alfa, interferón beta, oligonucleótidos CpG y derivados, poli(I:C) y derivados, ARN, sildenafil, formulaciones de partículas con poli(láctido co-glicólido) (PLG), virosomas, atezolizumab, interleucina (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21 e IL-23.

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

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

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de péptidos que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, conforme con la invención a mano 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 (preferentemente un péptido acorde con la presente invención), 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, pues, 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 seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499 o a una variante de las mismas que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ

ID N.º 499 o a una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de los linfocitos T con dicho péptido en que dicho péptido no es un polipéptido entero subyacente.

La presente invención se refiere además a un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499 o a una variante de las mismas que es al menos un 88% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, en que dicho péptido o variante tiene una longitud total de 8 a 100, preferiblemente de 8 a 30, y más preferiblemente de 8 a 14 aminoácidos.

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

La presente invención se refiere, además, a los péptidos acordes con la presente invención en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499.

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 de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón(incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico acorde con la 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 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

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

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

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

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

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

La presente invención se refiere, además, a un uso acorde con la invención, en que dichas células cancerosas son células de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio, u otras células de tumores sólidos o hematológicos como leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

La presente invención se refiere, además, a proteínas marcadoras y biomarcadores concretos basados en los péptidos acordes con la presente invención, aquí denominados «dianas», que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma

no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio. 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», en el término «anticuerpos» también se incluyen fragmentos (p. ej., fragmentos CDRs, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las moléculas de inmunoglobulina, siempre que exhiban alguna de las propiedades deseadas (p. ej., unión específica de un polipéptido marcador de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio, liberación de una toxina contra una célula de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio que expresa en un nivel elevado un gen marcador del cáncer, y/o que inhibe la actividad de un polipéptido marcador de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer

de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio) conforme a la invención.

Si es posible los anticuerpos de la invención se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entenderá que para fabricar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto los polipéptidos marcadores enteros como fragmentos de los mismos procedentes de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio. 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 el polipéptido de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, o una variante o fragmento de las mismas, 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 utilizado para generar el anticuerpo conforme a la invención específico contra leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar,

glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

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 biolongoevidad, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso, el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagenia de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagenia dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

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

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

Se pueden emplear animales transgénicos (p. ej., ratones) que tras la inmunización sean capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin producir inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección 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 $\mu\text{g/kg}$ y 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los susodichos factores. Tras la administración del anticuerpo, preferiblemente para tratar leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio, la eficacia del anticuerpo terapéutico se puede evaluar de varios modos bien conocidos por el médico especialista. Por ejemplo, se puede controlar el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer en el sujeto receptor del tratamiento utilizando

técnicas de imagen oncológicas estándar. Todo anticuerpo administrado con fines terapéuticos que detenga el crecimiento del tumor, reduzca su extensión y/o impida la aparición de nuevos tumores en contraste con la evolución de la enfermedad si no se produjera la administración del anticuerpo, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un receptor de linfocito T soluble (sTCR) que reconoce un complejo de péptido-MHC específico. Dichos receptores de linfocitos T solubles se pueden generar a partir de clones de linfocitos T específicos, cuya afinidad se puede incrementar por mutagenia dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). A fin de estabilizar los receptores de linfocito T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar por ejemplo mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191), y con dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia a un receptor. Se puede encontrar más información en WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. En WO 2012/056407A1 se describe una combinación de sTCR. Otros métodos 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 , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma

de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (Kd) es inferior a 1×10^{-6} M.

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 co-estimuladora 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 epítipo de MHC de clase I, los linfocitos T serán linfocitos T CD8-positivos.

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499, o una secuencia de aminoácidos variante de las mismas.

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 un 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 1 a la SEQ ID N.º 383 y SEQ ID N.º 448 a SEQ ID N.º 499.

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

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

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

Por «expresado de forma aberrante» los inventores también quieren decir que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles de expresión en los tejidos normales o que el gen permanece reprimido en el tejido del cual deriva el tumor,

pero en cambio sí se expresa en este último. Por «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el nivel del polipéptido es como mínimo 2 veces mayor que el nivel en el tejido normal; preferiblemente como mínimo 3 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 a partir de tejido tumoral relacionado con leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio, el medicamento de la invención se utiliza preferentemente para tratar esos mismos tipos de cáncer, a saber: leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir un producto farmacéutico personalizado para un paciente concreto, que comprende la fabricación de una composición farmacéutica que consta como mínimo de un péptido escogido de un archivo (base de datos) de TUMAP preseleccionados, en 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.

El archivo (p. ej., en forma de una base de datos) está compuesto por péptidos asociados a tumor que se sobreexpresan profusamente en el tejido tumoral de pacientes aquejados de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio 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 leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio, el archivo puede contener péptidos marcadores de HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 y HLA-B*44. 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 de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio procedentes de pacientes, así como de sangre extraída a donantes sanos:

1. Se identificaron ligandos HLA del material maligno con espectrometría de masas
2. Se efectuó un análisis hologenómico de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para descubrir los genes sobreexpresados en el tejido maligno (leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio) en comparación con una gama de órganos y tejidos normales.
3. Los ligandos HLA identificados se compararon con los datos de expresión génica. Los péptidos sobreexpresados o expresados selectivamente por el tejido tumoral,

preferiblemente los codificados por genes sobreexpresados o expresados selectivamente como los detectados en el segundo paso se consideraron TUMAP candidatos para la vacuna multi-peptídica.

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 leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

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 multi-peptídicos 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, cinco 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 sobrerepresentación en tumores respecto al correspondiente tejido normal; (c) selección de al menos un péptido de la base de datos que presente correlación con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente; y (d) opcionalmente, selección de al menos un péptido identificado *de novo* en el paso (a) para confirmar su inmunogenicidad.

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

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

Cada péptido se disuelve en DMSO antes de formar parte del producto. La concentración de cada solución de péptido se escoge dependiendo del número de péptidos que formarán parte del producto. Cada solución de péptido y DMSO se mezcla en partes iguales para obtener una solución que contenga todos los péptidos del producto con una concentración de ~2,5 mg/ml por péptido. La solución mezclada se diluye a 1:3 con agua

para inyectables hasta alcanzar una concentración de 0,826 mg/ml por péptido en DMSO al 33%. La solución diluida se filtra con un filtro estéril de 0,22 µm. Se obtiene la solución final a granel.

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

Además de ser útiles para el tratamiento del cáncer, los péptidos de la presente invención también son útiles para el diagnóstico. Dado que los péptidos son generados a partir de células de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio, 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 de la leucemia mieloide aguda, el cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer

de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio. 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.

FIGURAS

Las Figuras 1A a 1I muestran la sobrepresentación de varios péptidos en distintos tejidos cancerosos (puntos negros). Parte superior: Las medianas de las intensidades de la señal de EM en las mediciones técnicas duplicadas se representan gráficamente como puntos para cada HLA-B*07 positivo normal (puntos grises, parte izquierda de la figura) y cada muestra tumoral (puntos negros, parte derecha de la figura) en que se ha detectado el péptido. Las barras muestran la mediana y los percentiles 25º y 75º de las intensidades normalizadas de la señal, mientras que los bigotes se extienden desde el punto de dato mínimo dentro del intervalo intercuartílico (IQR) 1,5 del cuartil inferior hasta el punto de dato máximo dentro del IQR 1,5 del cuartil superior. Los órganos normales aparecen ordenados según categorías de riesgo (células sanguíneas, vasos sanguíneos, cerebro, hígado, pulmón; alto riesgo, puntos grises; todos los demás órganos; riesgo medio; puntos grises). Parte inferior: La frecuencia de detección relativa del péptido en cada órgano se muestra en forma de gráfico de espina. Las cifras expuestas debajo del recuadro indican el número de muestras en que se detectó el péptido del total de muestras analizadas de cada órgano (N = 87 muestras normales y N = 149 muestras tumorales). Si el péptido se detectó en una muestra, pero por razones técnicas no pudo ser cuantificado, la muestra se incluyó en esta representación de la frecuencia de detección, pero no figura en la parte superior de la figura. Tejidos de izquierda a derecha: Muestras normales: células sanguíneas (células sang.), vasos sanguíneos (vasos sang.), cerebro, corazón, hígado, pulmón, glándula suprarrenal (gl. suprarr.), vía biliar, vesícula, médula ósea, esófago (esof), vesícula biliar (ves. biliar), intestino grueso (int. grueso), intestino delgado (int. delgado), riñón, nervio periférico (nerv. perif.), páncreas, hipófisis, piel, médula espinal, bazo, estómago, tiroides y tráquea. Muestras tumorales: LMA (leucemia mieloide aguda), CM (cáncer de mama), CCC (carcinoma colangiocelular), LLC (leucemia linfocítica crónica), CRC (cáncer colorrectal), CVB (cáncer de vesícula biliar), GBM (glioblastoma), CG (cáncer gástrico), CHC (carcinoma hepatocelular), CECC (carcinoma epidermoide de cabeza y cuello), MEL (melanoma), LNH (linfoma no

hodgkiniano), CPNMaden (cáncer de pulmón amicrocítico - adenocarcinoma), CPNMotro (muestras de CPNM que no se pueden asignar inequívocamente a los tipos CPNMaden o CPNMepiderm), CPNMepiderm (cáncer de pulmón amicrocítico – epidermoide), CO (cáncer de ovario), CE (cáncer de esófago), CPc (cáncer de páncreas), CPp (cáncer de próstata), CCR (carcinoma de células renales), CPM (cáncer de pulmón microcítico), CVU (carcinoma de vejiga urinaria), CUE (cáncer de útero y endometrio).

Figura 1A) Péptido: TPRIGPKVSL (SEQ ID N.º 206), Figura 1B) Péptido: RPILKEQSSSF (SEQ ID N.º 246), Figura 1C) Péptido: RPDVVRTLL (SEQ ID N.º 308), Figura 1D) Péptido: SPSLQSSRESL (SEQ ID N.º 312), Figura 1E) Péptido: NPREPEKSL (SEQ ID N.º 335), Figura 1F) Péptido: VPPQNPRPSL (SEQ ID N.º 335), Figura 1G) Péptido: IPTSRVITL (SEQ ID N.º 337), Figura 1H) Péptido: KPRATWTL (SEQ ID N.º 353), Figura 1I) Péptido: SPRRLVELAGQSL (SEQ ID N.º 359).

Las Figuras 2A a 2T muestran, a título de ejemplo, perfiles de expresión de genes originarios de la presente invención que aparecen sobreexpresados en distintas muestras oncológicas. Las muestras tumorales (puntos negros) y normales (puntos grises) se agrupan según el órgano de origen. Los diagramas de barras y bigotes representan el valor de FPKM (mediana), los percentiles 25º y 75º (barra) más los bigotes que se extienden hasta el punto de dato mínimo que sigue dentro del intervalo intercuartílico 1,5 (IQR) del cuartil inferior y el punto de dato máximo que sigue dentro del IQR 1,5 del cuartil superior. Los órganos normales aparecen ordenados según las categorías de riesgo. FPKM: fragmentos por kilobase por millón de lecturas mapeadas. Muestras normales: células sanguíneas, vasos sanguíneos (vasos sang.), cerebro, corazón, hígado, pulmón, tejido adiposo (adiposo), glándula suprarrenal (gl. suprar.), vía biliar, vejiga, médula ósea, esófago, ojo, vesícula biliar (ves. biliar), cabeza y cuello, intestino grueso (int. grueso), intestino delgado (int. delgado), riñón, ganglio linfático, nervio periférico, páncreas, glándula paratiroidea (paratir.), peritoneo, hipófisis, pleura, músculo esquelético (mús. esquel.), piel, bazo, estómago, tiroides, tráquea, uréter, mama, ovario, placenta, próstata, testículo, timo y útero. Muestras tumorales: LMA (leucemia mieloide aguda), CM (cáncer de mama), CCC (carcinoma colangiocelular),

LLC (leucemia linfocítica crónica), CCR (cáncer colorrectal), CVB (cáncer de vesícula biliar), GBM (glioblastoma), CG (cáncer gástrico), CHC (carcinoma hepatocelular), CECC (carcinoma epidermoide de cabeza y cuello), MEL (melanoma), LNH (linfoma no hodgkiniano), CPNMaden (cáncer de pulmón amicrocítico - adenocarcinoma), CPNMotro (muestras de CPNM que no se pueden asignar inequívocamente a los tipos CPNMaden o CPNMepiderm), CPNMepiderm (cáncer de pulmón amicrocítico – epidermoide), CO (cáncer de ovario); CE (cáncer de esófago), CPc (cáncer de páncreas), CPr (cáncer de próstata), CCR (carcinoma de células renales), CPM (cáncer de pulmón microcítico), CVU (carcinoma de vejiga urinaria), CUE (cáncer de útero y endometrio).

Figura 2A) Símbolo del gen: KLK2, Péptido: RPRSLQCVSL (SEQ ID N.º 1), Figura 2B) Símbolo del gen: TGM4, Péptido: GPKKFIVKL (SEQ ID N.º 4), Figura 2C) Símbolo del gen: PRAME, Péptido: LPSLSHCSSL (SEQ ID N.º 5), Figura 2D) Símbolo del gen: MMP12, Péptido: AVHEIGHSL (SEQ ID N.º 14), Figura 2E) Símbolo del gen: FAM178B, Péptido: WPRLPGAGL (SEQ ID N.º 19), Figura 2F) Símbolo del gen: LOC645382/LOC645399/PRAMEF10, Péptido: APSRLLEL (SEQ ID N.º 21), Figura 2G) Símbolo del gen: MAGEC1, Péptido: SPSFSSTLLSL (SEQ ID N.º 26), Figura 2H) Símbolo del gen: CYP4Z1/CYP4Z2P, Péptido: FPAPPAHWF (SEQ ID N.º 16), Figura 2I) Símbolo del gen: UPK2, Péptido: APLLPIRTLPL (SEQ ID N.º 58), Figura 2J) Símbolo del gen: ALPPL2, Péptido: DAAHPGPSV (SEQ ID N.º 82), Figura 2K) Símbolo del gen: MMP1, Péptido: HAIEKAFQL (SEQ ID N.º 90), Figura 2L) Símbolo del gen: COL10A1, Péptido: TPIPFDKILY (SEQ ID N.º 100), Figura 2M) Símbolo del gen: LAMC2, Péptido: RSYQHSLRL (SEQ ID N.º 116), Figura 2N) Símbolo del gen: LAMC2, Péptido: SPQLSYFEY (SEQ ID N.º 137), Figura 2O) Símbolo del gen: SLC45A2, Péptido: VPFNLITEY (SEQ ID N.º 138), Figura 2P) Símbolo del gen: QRFPR, Péptido: HPFKMKWQY (SEQ ID N.º 142), Figura 2Q) Símbolo del gen: KBTBD8, Péptido: TPMTVPRI (SEQ ID N.º 159), Figura 2R) Símbolo del gen: KBTBD8, Péptido: YAYTSRVIL (SEQ ID N.º 166), Figura 2S) Símbolo del gen: NLRP2, Péptido: LPKAALLV (SEQ ID N.º 241), Figura 2T) Símbolo del gen: DCAF4L2, Péptido: APSMLRKNQL (SEQ ID No.: 358).

Las Figuras 3A a 3G muestran resultados a título de ejemplo de respuestas de linfocitos T CD8+ específicos de péptido procedentes de un donante sano HLA-B*07+ en condiciones *in vitro*. Los linfocitos T CD8+ fueron estimulados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-B*07 formando un complejo con el péptido de SEQ ID N.º 388 (SPSVSLSVL) (Figura 3A, recuadro izquierdo) y con el péptido de SEQ ID N.º 406 (LPDGSRLVEL) (Figura 3B, recuadro izquierdo), SEQ ID N.º 23 péptido (VPRPTSTVGL) (Figura 3C, recuadro izquierdo), SEQ ID N.º 33 péptido (LPRGLSPARQL) (Figura 3D, recuadro izquierdo), SEQ ID N.º 61 péptido (LPRIPFSTF) (Figura 3E, recuadro izquierdo), SEQ ID No.: 64 péptido (VPRPIFSQLYL) (Figura 3F, recuadro izquierdo), SEQ ID No.: 68 péptido (FPNEVSVVL) (Figura 3G, recuadro izquierdo). Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D con multímeros con B*07/SEQ ID N.º 388 (Figura 3A), B*07/ SEQ ID N.º 406 (Figura 3B), B*07/ SEQ ID N.º 23 (Figura 3C), B*07/ SEQ ID N.º 33 (Figura 3D), B*07/ SEQ ID N.º 61 (Figura 3E), B*07/ SEQ ID N.º 64 (Figura 3F) o B*07/SEQ ID N.º 68 (Figura 3G). El recuadro de la derecha (Figura 3A a 3G) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos B*07/péptido irrelevantes. Los linfocitos CD8+ se seleccionaron entre las células en singlete viables. La aplicación de operadores booleanos ayudó a excluir los falsos positivos detectados con los multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

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

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes procedían de: Asterand (Detroit, MI, EE. UU. y Royston, Herts, Reino Unido), Bio-Options Inc. (Brea, CA, EE.UU.), BioServe (Beltsville, MD, EE. UU.), Conversant Bio (Huntsville, AL, EE.UU.), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE. UU.), Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto (KPUM) (Kyoto, Japón), Universidad de la Ciudad de Osaka (Osaka, Japón), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE. UU.), Centro del Cáncer de Stanford (Stanford, CA, EE.UU.), Tissue Solutions Ltd. (Glasgow, Reino Unido), Hospital Universitario de Bonn (Bonn, Alemania), Hospital Universitario de Ginebra (Ginebra, Suiza), Hospital Universitario de Heidelberg (Heidelberg, Alemania), y Hospital Universitario de Tubinga (Tubinga, Alemania).

Los tejidos normales procedían de Asterand (Detroit, MI, EE. UU y Royston, Herts, Reino Unido), BioServe (Beltsville, MD, EE. UU.), Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, EE. UU.), Centro de Medicina Transfusional de Tubinga (Tubinga, Alemania), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE. UU.), Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto (KPUM) (Kyoto, Japón), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE.UU.), Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido) y Hospital Universitario de Tubinga (Tubinga, Alemania).

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

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido congeladas instantáneamente se obtuvieron por inmunoprecipitación de tejidos sólidos siguiendo un protocolo ligeramente modificado (Falk et al., Nature 351 (1991): 290-296; Seeger et al., Immunogenetics 49 (1999): 571-576) con el anticuerpo específico de HLA-A*02 BB7.2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, el anticuerpo específico de HLA-DR L243 y el anticuerpo específico de los HLA DP B7/21, sefarsa 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 espectrómetros de masas híbridos LTQ- *velos and fusion* (ThermoElectron) equipados con una fuente de ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar analítica 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 de 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 con una tasa de descubrimiento falso fija ($q \leq 0,05$) y control manual adicional. En los casos en los que la secuencia peptídica identificada era incierta esta se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia.

La cuantificación relativa de la CL-EM sin marcaje se efectuó por recuento iónico, es decir por extracción y análisis de las características de CL-EM (Mueller et al., 2007). El método supone que las áreas de la 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 de 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 a dos niveles 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 las muestras de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio sobre valores de referencia (basales) correspondientes a muestras de tejidos normales. En las Figuras 1A-1I se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrerepresentados a modo de ejemplo.

La Tabla 8a y 8b muestran la presentación de los péptidos seleccionados en varias entidades tumorales, y por ende la relevancia concreta de los péptidos mencionados en el diagnóstico o el tratamiento de los cánceres indicados (p. ej., el péptido de SEQ ID N.º 22 para el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello y el cáncer de esófago, el péptido de SEQ ID N.º 34 para el cáncer de útero y de endometrio).

Tabla 8a: Resumen de la presentación de péptidos asociados a tumor seleccionados de la presente invención en distintas entidades.

Tipo de cáncer: LMA (leucemia mieloide aguda), CM (cáncer de mama), CCC (carcinoma colangiocelular), LLC (leucemia linfocítica crónica), CRC (cáncer colorrectal), CVB (cáncer de vesícula biliar), GBM (glioblastoma), CG (cáncer gástrico), CHC (carcinoma hepatocelular), CECC (carcinoma epidermoide de cabeza y cuello), MEL (melanoma),

LNH (linfoma no hodgkiniano), CPNMaden (cáncer de pulmón amicrocítico - adenocarcinoma), CPNMotro (muestras de CPNM que no se pueden asignar inequívocamente a los tipos CPNMaden o CPNMepiderm), CPNMepiderm (cáncer de pulmón amicrocítico – epidermoide), CO (cáncer de ovario), CE (cáncer de esófago), CPc (cáncer de páncreas), CPr (cáncer de próstata), CCR (carcinoma de células renales), CPNM (cáncer de pulmón microcítico), CVU (carcinoma de vejiga urinaria) y CUE (cáncer de útero y de endometrio)

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
1	RPRSLQCVSL	CPr
2	VPGSDPARYEFL	CE
3	MPYVVLTA	CCR
4	GPKKFIVKL	CPr
5	LPSLSHCSQL	MEL
6	LPLNSSTSL	CPNM
8	MPKTNLSKM	CECC
12	LPNTGRIGQLL	CPNMaden
13	LPNTGRIGQL	CPr
14	AVHEIGHSL	CPNMaden
15	KPGFNISIL	CM
16	FPAPPAHWF	CM
17	SPAAPLSPASSL	CVU
18	MALSVLRLAL	CVB, CG, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CPNM
20	MVLGIGPVL	CRC, CVB, CECC, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CPNM, CUE
21	APSRLLLEL	CHC
22	LPQLKPAL	CECC, CE
23	VPRPTSTVGL	MEL
24	VPRPTSTVGLFL	MEL
25	RPQGAVGGL	CHC
27	RIRVTSEVL	CM
29	APLRVHITSL	MEL
31	RPGPSDPAA	CPNMaden
32	APMAPGRSPL	CUE
33	LPRGLSPARQL	CUE
34	APMAPGRSP	CM, CUE
35	APLPPPRAL	GBM
36	RPFSREMDL	LMA, CO
38	RPSFPNLTSF	LMA, CO

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
39	QPRPSSEKI	LMA
40	FPRTVKHIDAAL	CRC
42	APLKMLAL	MEL, CO
43	APTPRPKVL	CM
45	TRPWSGPYIL	MEL
46	QPISGNPVTI	LNH, CPNMepiderm, CPNM , CVU
47	RPRQTGALM	LMA
48	RPRYSIGL	CM
49	APEKARAFL	CE
50	PEKARAFL	CE
51	SPVFYVQTL	CM
53	SPRIPFSTF	MEL
54	VPSCGRSVEGL	LLC, CVB, LNH, CPNMaden, CO, CE, CPc, CCR, CUE
55	LPALLRSGL	CCC, CVB, CHC, CECC, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CCR, CPNM
56	LPALLRSGLTL	CM, CCC, CRC, CVB, CHC, CECC, MEL, LNH, CPNMaden, CO, CE, CCR
57	APLLPIRTL	CVU
58	APLLPIRTLPL	CVU
59	KPRTIYSSL	CE, CUE
60	RPYSIYPHGVTF	CCC, CVB, CHC
61	LPRIPIFSTF	MEL
63	FPHMATTAF	CECC
64	VPRPIFSQLYL	LNH, CUE
65	FPNVYSTLV	MEL
66	LPMTVISVL	CVB
67	VPVSRPVL	LLC, LNH
68	FPNEVSVVL	CM, MEL, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE
69	RPEDGRPRL	GBM
70	VPAQRLGLL	LMA, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE
71	APFAPLHGGGSL	CPr
72	APCNGNVAV	CM, CPNMaden
73	LPVSSPVTI	CM, CPNMepiderm
74	VPVSHPVL	LLC, LNH
76	KPKVESQAL	CM
77	QPRLVPGETL	CVB, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMepiderm
78	HPSQESPTL	CPNMepiderm, CO, CCR, CVU, CUE
79	GPASDHPSL	CO, CPr, CUE
80	SALPTTISF	CECC, CE, CPNM

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
82	DAAHPGPSV	CUE
83	AVSSHNNVI	CCR
84	MPMQDIKMI	CUE
85	MPMQDIKMILKM	CO, CPNM
86	ALLLRGVTL	CPNM
87	APVGGNVTSSF	CE
88	KPSAVKDSIY	CECC, CCR
89	FLIPRAGWLAGL	CRC
90	HAIEKAFQL	CRC
91	FPRLVGPdff	CO
92	TSPLPPTV	LMA, CECC
93	SVAIAHGVF	LLC, CRC
94	LPMSKRQEY	CO
95	RTKEEINEL	CPNMaden
96	QPSLVQAIF	CO
97	LPPGTQIQI	CRC
98	FPCSALLACF	CE
99	MPVSAFTVI	CG, CPNMepiderm
100	TIPIFDKILY	CE
101	KPGLPGLK	CM, CRC, GBM, CHC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CCR, CPNM, CVU, CUE
102	MAGPAIHTAPM	CECC
105	RPRYETGVCA	CRC
106	APFHIDRLF	CO, CCR
107	GQRLESPGGAA	LMA, CCC, LLC, CRC, CVB, CHC, CECC, CPNMepiderm, CPc, CVU, CUE
108	APRGSPPI	CHC, CO, CE, CPc, CCR
110	YPSSPASAV	CG
111	YPLQQTNVY	CCR
112	YPSPLNKHsf	CCR
114	FVPPSGPSNPM	CECC
115	KTKSLAQQI	CRC, CPNMaden, CUE
116	RSYQHSLRL	CRC
117	IPHQRSSL	LLC
118	NPERHKPSF	LMA
119	KATEYVHSL	CRC, CUE
120	TVRPKNAAL	LMA, CHC, CE, CUE
121	GPFQRAAL	CUE
122	KPRTPFtTAQLL	CUE
123	RPRLRDLPAL	LLC, CVB, LNH, CO, CE, CCR

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
124	KTIDGHINL	CRC, CPNMaden, CPNMotro
125	SPAKQFNII	CPNM
126	MPREDAHF	MEL
127	KSKQVITLL	CPNMepiderm
128	SPPATLFLFLL	CE
129	MTLPATTLTL	CM, CCC, LLC, CRC, CVB, GBM, CHC, CECC, MEL, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CCR, CPNM, CVU, CUE
130	GAYDKARYL	CM
131	MPFRNIRSIL	CHC
132	LPRLPVGSLV	CG
133	LPELPTTLTF	CPNMaden
134	VAAAARLTL	MEL
135	MPRLRLSL	CUE
136	QPDHAGIFRVF	CECC, CE
137	SPQLSYFEY	CE
138	VPFNLITEY	MEL
139	LVILQHQM	CCR
140	TPFPDIHWF	CPNMepiderm, CCR, CPNM
141	YGPYGSWSGW	CG
142	HPFKMKWQY	CCR
143	YPMIPPAQL	CPNM
144	RPVQGIPTY	MEL
145	VPAQRLGLLL	CM, GBM, CECC, CPNMepiderm, CO
146	SPTRGSEF	GBM
147	HVAQPAVVL	CM, CHC
148	KPHLIYRQ	LMA, CM, CRC, CHC, CECC, MEL, CPNMaden, CE, CCR, CPNM, CUE
149	SPSSVFTSK	CM
150	APLHGGGSL	CPr
151	QPTWNTQTRL	LNH
152	SSASFSEIFRH	CM, CCC, CE, CPc, CPNM, CUE
153	QPVHSLCSA	CG
154	RPPPSRRVL	GBM
155	APIPRLIEG	CE
156	GSRPVTGSV	CM
157	RPVTGSVC	CM, CPNMaden
158	SVPVATVEL	LLC
159	TPMTVPRI	LLC, LNH
160	IPVSHPVLT	CM, CRC, GBM, CHC, CPNMaden

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
161	ASKILETSL	MEL
163	FRYPNGVSL	CHC
164	RAAGRRLQL	CHC
166	YAYTSRVIL	LNH
167	NVNPARKGL	LMA
168	SPSGQRDVSL	MEL
169	RPFSVSSISQL	MEL
170	APEGKRLGF	MEL
171	LPLGGHKSL	MEL
172	SAQSLHPVL	GBM
173	VIINNPISL	CPNMotro
174	IPVTSSVTL	CPNMepiderm, CE
175	AAFPHKIIF	CE
176	QPLDICHSF	CO
177	VWEPQGSSRSL	CUE
178	VPYYPRANL	CE
179	PRVRLLLL	CVB, CECC
180	RLRDYISSL	LLC, LNH
181	LPVSPARAL	CECC, CPNMaden, CPNMepiderm, CE
182	RPLPVSPARAL	CM, CPNMaden, CPNMepiderm
183	VPRRPARAL	CM, GBM, MEL
184	KIIASGNHL	CPNMotro
185	RPVLTASSF	LNH
188	HAAASFETL	CPNMaden
189	QPQCSTHIL	CCC, CHC, CE
190	RLAHVRARL	CUE
191	KPKAVKPKAA	CPNMaden
192	IPFADVKSF	CPNMaden, CPNMepiderm, CPNM
193	LPALKEEAF	CPr
194	HPNKKIKASL	CM
195	NPIFGRKEL	CUE
196	RPSGTAGAAL	CECC, CPNMepiderm, CCR
197	RPSGTAGAALLA	CHC
198	LPSPAHAFRAL	CO
199	SPFWIHQA	LMA
200	EPFHLIVSY	CRC, CECC, MEL, CPNMaden, CPNMepiderm, CE, CCR, CPNM
201	LPIARVLTV	CUE
202	SPSREASAL	LLC, GBM, CVU
203	KPRGPIDI	CRC, CVB, CPNMaden

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
204	FPYSGDKILV	LMA, CRC, CG, CHC, MEL, CPNMepiderm, CPc, CPNM , CVU, CUE
205	LPPALLTTV	CG
206	TPRIGPKVSL	LMA, CM, CCC, LLC, CRC, CVB, GBM, CG, CHC, CECC, MEL, CPNMaden, CPNMepiderm, CE, CPc, CCR, CPNM , CVU, CUE
207	VPSDITTAF	CPNMaden, CE, CPNM
208	RNRQVATAL	CCC, CRC, CVB, CECC
209	KIEQIRAVL	CE
210	IPENRVVSY	CE
211	IPDTIASVL	MEL
212	VPYAAQAAL	CM
214	LPLKFFPII	CUE
215	IPVAIKEL	CPNMotro
216	LPWEQNEQV	CHC
217	SPGDKRLAAYL	CCC, CHC
218	VQRTPPPI	CG, CPNMaden, CPNMepiderm, CE
219	VPHTGRYTCL	CCR
220	RPAPGPAPFV	CM
221	LPQRPNARL	CCC, CRC, CVB, CG, CHC, CECC, MEL, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CCR, CPNM , CVU, CUE
222	MLKTTLTAF	CHC
223	KAHVRIEL	CRC
226	APGGSSRSSL	LMA
229	FPNAGPRHLL	LMA, LLC, LNH, CO, CCR
230	DVIDDIISL	GBM, CHC, CECC, LNH, CPNMepiderm
231	SPITLQAL	CHC
232	TAYPSLRLL	CM, CHC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMepiderm, CPc, CPNM , CUE
233	MAYDRFIAI	CRC, CVB, CPNMaden, CCR
234	HPRAPGEQQRL	CM, CRC, CUE
235	AQNPA GTAL	MEL
236	TPELKSSIL	CHC
237	LPRAGGAF	CVB, CG, CPNMaden, CPc, CCR
238	LPRAGGAFLM	CECC
239	VLPRAGGAFLM	CPNMaden
241	LPKAALLV	LLC
242	IPETASVVAI	LMA, CCC, CRC, CPNMaden, CPNMepiderm
243	MARTGGMVVI	CRC, CPNMaden, CPNMepiderm

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
244	VPAHLVAA	CG
245	GPVPSPLAL	CO
246	RPILKEQSSSSF	CVB, CECC, CPNMepiderm, CE
247	SPVGVGQRL	CPNM
249	SPRSGVLL	CE, CUE
250	APAAPAAVPS	CRC, GBM, CO
251	MPVDSFNMS	MEL, CPNMaden, CPNMepiderm, CCR, CPNM , CVU
252	QPENSLEGISL	CPNMepiderm
253	MPVDSFNMSL	CRC, MEL, CPNMepiderm, CPNM , CVU
254	RVIQGTTL	CHC
255	VPSHWMVAL	LNH
256	SPVPSHWMVAL	LLC, LNH
257	APYGTLRKS	MEL
258	SVIGPNSRL	CPNM
259	VPMPGVQAV	CUE
260	LVQSSRSEV	CECC, CE
261	SPSTSRTPL	CVB, GBM, CHC, CECC, CPNMaden
262	SPSTSRTPLLSSL	CM, CCC, CVB, GBM, CHC, CECC, LNH, CE, CCR, CUE
263	SQRPPATSQA	LMA, CM, CCC, LLC, CRC, GBM, CHC, CECC, LNH, CO, CE, CPc, CPr, CCR
264	APRPGNWIL	MEL, CPNMepiderm
266	KPYEGRVEI	LLC, GBM
267	MPVPGILL	MEL
268	EPLSVTASY	CECC
269	FTVSSSSAM	CVB
270	SPRGTTSTL	CCC, CRC, CVB, CHC, LNH
271	SPTPVFTTL	CRC, CVB
272	SSPRGTTSTL	CVB, CE
273	TDTPSTTPTTI	CCC, CRC, CVB, GBM, CHC, MEL, CPNMaden, CE, CPc, CPr, CCR, CPNM , CUE
274	KPIRTGISPLAL	CCC, CHC
276	RPVWDVRS	CECC
277	MPPLLIVAF	CO
278	LIAARGSLVL	LMA, CRC, MEL, CPNMaden, CE, CPNM , CUE
279	APADEPRTVL	CPNMepiderm
280	LPRAFLQSL	CRC, LNH, CPNMepiderm
281	NPRSPPATM	LMA, CO
282	AVRLPTPNL	LMA
284	RPSAPRGPP	CRC, CE

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
285	RITWKGLLL	CPNMotro
286	APARPAAAF	CM, MEL, CPNMadeno, CO, CCR
287	SPIPRPLFL	CM
288	LHAMNSLSAM	LNH
289	LPYEKVSRL	CCC, LNH
291	SPSKSLEM	CRC
292	LPMTHRLQL	MEL
293	FPYDKPLIM	CG, CPNMadeno
296	SPLLMQRTL	LLC, LNH
297	FPIKYVNDP	CCR
298	RVLLRWISL	GBM
299	SPFSGGPVSF	CCR
300	HPYSDLADV	MEL
301	FPAFLEAM	MEL
302	IPIDQILNSF	MEL
303	RPPPPCIAL	MEL
304	SPLIGDFPAF	MEL
305	AASPVGSAL	CHC
306	RPFPLALL	CRC
307	RPHQKGWLSI	CHC
308	RPDVVRTLL	CRC, CVB, CG, CECC, MEL, CPNMadeno, CPNMepiderm, CE, CPc, CCR, CVU
311	APRLALDPDAL	CM, CPNM
312	SPSLQSSRESL	CVB, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CE, CVU
313	VPLSSYVSI	MEL
314	IALMKLAGPL	LMA, CRC, CHC, MEL, LNH, CPNMadeno, CUE
316	NPREPEKSL	CM, CRC, CVB, CG, CHC, CE, CPNM
317	MPYNSAHHCVV	LLC, LNH
318	TPISNTGVL	LMA, CVB, LNH, CPNMadeno, CPNMotro, CCR
319	RPLDTFRVL	CE
320	APMHIDRNIL	CHC
321	QPQQPGFFL	LLC
322	RAVPVGSGL	MEL, CPNMadeno, CPNMepiderm
323	TPHGITDIL	CRC, CUE
324	LPAPLRISL	CM, GBM, MEL, CPNMadeno, CO, CUE
325	SPRSNPVRL	LNH
326	IPPFTQRVF	CO
327	GPRTTQSSVL	CPNMadeno
328	LPLHRGDLVI	LLC
329	QPANFIVLL	CVB

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
330	RPFSAIAEL	CVB
331	SPDSAILKL	CPNMepiderm, CUE
332	SPYAGSTAF	LMA, CPNMaden
333	SVLPRALSL	CM
334	YPLSLALHF	CO
335	VPPQNPRPSL	LMA, GBM, CECC, LNH, CPNMaden, CE
336	YPLQGPGLLSV	LNH
337	IPTSRVITL	CM, LLC, CHC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPNM
338	MPATPSLKV	CECC, CO, CPc, CVU
339	GPQRTTSV	CCC
340	APEPRAALL	MEL, CPNMepiderm, CO
343	RPRPPKVLGL	LMA, CCC, CHC, MEL, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CCR, CPNM, CUE
344	VPYPSPTCV	CM, CHC, CUE
345	SAAPPGASL	CHC
346	IPMPRITWL	CM
347	SPLEKINSF	CVB
348	HPAPPVTSA	CO
349	QPRDGWPMML	CECC, CE
350	RPKSTLMNF	CO, CE
351	SPYADIIPSA	CECC
352	LPAFSKIGGIL	CRC, MEL
353	KPRATWTL	LMA, CM, CCC, LLC, CVB, CG, CHC, CECC, MEL, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CCR, CPNM, CUE
354	APAKDARASL	CRC, CVB, CECC, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CVU
355	APKTSFIAA	CG
356	RPFLRLPSL	CRC, CHC, CECC, CO, CE
357	LPPHIFAI	CRC, CG, CHC, CUE
358	APSMRLRKNQL	CHC
359	SPRRLVELAGQSL	MEL, CO, CE, CUE
361	SPYGSDRLVQL	LLC, LNH
362	KPMLPPAAF	CUE
363	KPRTPFHTA	CUE
364	KPRTPFHTAQL	CM, CRC, GBM, CCR, CUE
365	RPKHFLQML	CE
366	SPTLRQLDL	CCC, CHC
367	APQVHIFSL	CM, CRC, GBM, CCR, CUE

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
368	NPASRLTAL	CM, CCC, CRC, CVB, GBM, CG, CHC, CECC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CCR, CPNM, CVU, CUE
370	AAHEFGHVL	CM, CUE
371	APRSPGQVTPRGL	CPNMaden, CO
372	SPSSASLTL	CVB, CPNMepiderm, CE
373	LPKPDLPQLI	LMA, CM, CHC, MEL, CPNMaden, CPr, CCR, CUE
374	KPRNMTGLDL	LLC
375	LPRGVLEGL	CRC, CPNMaden, CUE
376	FPQVGRTAL	LMA, CM, CCC, LLC, CRC, CVB, CG, CHC, CECC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CCR, CPNM, CVU, CUE
377	SPFSKRIKL	LMA, CM, LLC, CG, CECC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CCR, CPNM, CVU, CUE
379	GPRQVLFPL	LMA, CM, CCC, CRC, CVB, GBM, CG, CHC, CECC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CCR, CPNM, CVU, CUE
380	SPYPGSAAF	CM, CPNMaden, CE
381	APRPRLLLL	LMA, CM, CCC, LLC, CRC, CVB, GBM, CG, CHC, CECC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CCR, CPNM, CVU, CUE
382	RPGPQRTTSV	CM, CCC, LLC, CHC, MEL, LNH, CO, CE, CPr, CPNM, CUE
383	KPRATWTLKL	CM, CCC, CRC, CVB, CG, CHC, CECC, MEL, LNH, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CCR, CPNM, CUE

Tabla 8b: Resumen de la presentación de péptidos asociados a tumor seleccionados de la presente invención en distintas entidades.

LMA: leucemia mieloide aguda; CM: cáncer de mama; CCC: carcinoma colangiocelular; LLC: Leucemia linfocítica crónica; CCR = cáncer colorrectal; CVB: cáncer de vesícula biliar; GBM: glioblastoma; CG = cáncer gástrico; CHC: carcinoma hepatocelular; CECC= carcinoma epidermoide de cabeza y cuello; MEL = melanoma; LNH: linfoma no hodgkiniano; CPNMaden: cáncer de pulmón amicrocítico – adenocarcinoma; CPNMotro: muestras de CPNM que no se pueden asignar inequívocamente a los tipos CPNMaden o CPNMepiderm; CPNMepiderm: cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide; CO: cáncer de ovario; CE = cáncer de esófago; CPc = cáncer de páncreas;

CPr = cáncer de próstata; CCRn = carcinoma de células renales; CPM: cáncer de pulmón microcítico; CVU: carcinoma de vejiga urinaria; CUE: cáncer de útero y endometrio.

SEQ ID N.º	Secuencia	Presentación del péptido en las entidades tumorales
448	TVYGEPRKL	CE
449	RPKTSVNLISL	CPM
450	SAAARALLP	CCC, CCR, GBM, CG, CHC, CPNMotro, CPNMepiderm, CPc, CPM, CUE
451	VPILPLNHAL	CUE
454	SPDPAHLESL	CPNMotro
455	FPVQATIDF	CO
456	VPVSHPVLT	CPNMepiderm
457	RPPLSQRHTF	LNH
459	SPAPWRPWI	CPM
460	APLMPLGKTL	CPc
461	MPHLGPGILL	MEL
462	MPLLADVRL	MEL
463	LPTDLFNSVM	MEL
467	VPRNQDWLGVSRQL	MEL
468	LPSLHVLVL	MEL
469	LPLDTRTSI	LLC
470	RPNGEVKSEL	CPM
471	LPLLAGTLLL	CPNMaden
472	LPMPAITWY	MEL
473	LPGEREAL	MEL
474	VPKADLLTL	MEL
475	IPLEIQKL	MEL
476	EPNPVEEIF	CPNMepiderm
477	NPVPVITWYKDNRL	MEL
478	APKFISPASQL	CPM
479	APHAGGALL	CPNMepiderm
480	VPAAPTAL	LLC
481	SPARALLALA	CECC
482	QPSLKKIIL	CPc
484	LPASAEPKGTM	CECC
485	LPLKTKVFA	CPNMepiderm
486	TPTRPLPSA	CPNMaden
487	IPWFIKTAF	MEL
488	LPLGGLPLLI	LLC
489	WPNHIMLVL	MEL
491	MPEADLKRIF	MEL

492	IPFSVDEI	CPNMotro, CUE
493	LPLQQYKLV	CHC
494	LPLRAVNLNL	CPM
495	SPSYTQASL	CM
496	MPAVSGPGPLF	CPNMaden
497	YVVKPLHPF	CCR
498	RPQPQPRPAL	CECC, CE
499	QPVLPSPAC	MEL

EJEMPLO 2

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

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

Fuentes de ARN y preparación

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

El ARN total procedente de tejidos humanos sanos para los experimentos de RNASeq se obtuvo de: Asterand (Detroit, MI, EE. UU y Royston, Herts, Reino Unido); Bio-Options

Inc. (Brea, CA, EE. UU.); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE. UU.); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE. UU.), Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido).

El ARN total procedente de tejidos tumorales para los experimentos de RNASeq se obtuvo de: Asterand (Detroit, MI, EE. UU y Royston, Herts, Reino Unido); BioCat GmbH (Heidelberg, Alemania); BioServe (Beltsville, MD, EE. UU.); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EE. UU.); Istituto Nazionale Tumori «Pascale" (Nápoles, Italia); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EE. UU.); Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido); Hospital Universitario de Heidelberg (Heidelberg, Alemania).

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

Experimentos de RNAseq

El análisis de la expresión génica de las muestras de ARN procedentes de tejidos tumorales y normales se efectuó con secuenciación de nueva generación (RNAseq) en CeGaT (Tubinga, Alemania). En resumen, se prepararon bibliotecas de secuenciación con el kit de reactivos Illumina HiSeq v4 siguiendo el protocolo del fabricante (Illumina Inc, San Diego, CA, EE.UU.), que incluye la fragmentación del ARN, su conversión a ADNc y la adición de adaptadores de secuenciación. Las bibliotecas derivadas de múltiples muestras se mezclaron equimolarmente y se secuenciaron en un secuenciador Illumina HiSeq 2500 siguiendo las instrucciones del fabricante, dando como resultado lecturas desde un solo extremo de 50 pb. Las lecturas procesadas se cartografiaron en el genoma humano (GRCh38) con el software STAR. Los datos de expresión se proporcionan a nivel de transcrito en forma de RPKM (lecturas por kilobase por cada millón de lecturas cartografiadas, generadas con el software Cufflinks) y a nivel de exón (lecturas totales, generadas con el software Bedtools), basada en anotaciones de la base de datos de secuencias Ensembl (Ensembl77). Las lecturas de los exones se normalizaron para la longitud del exón y el tamaño de alineación para obtener los valores en RPKM.

En las Figuras 2A-2T se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios de la presente invención que aparecen muy sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluidos el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio. La Tabla 9a y 9b exponen los grados (o puntuaciones) de expresión de otros genes a título de ejemplo.

Tabla 9a: Grados de expresión. La tabla enumera los péptidos de los genes que aparecen sobreexpresados (+), muy sobreexpresados (++) o extremadamente sobreexpresados (+++) en los tumores con respecto a un conjunto de tejidos normales. El valor de referencia (basal) de esta puntuación se calculó con mediciones de los siguientes tejidos normales: tejido adiposo, glándula suprarrenal, vía biliar, células sanguíneas, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebro, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, cabeza y cuello, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, nervio, glándula paratiroidea, páncreas, hipófisis, pleura, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroidea, tráquea, uréter y vejiga urinaria. En caso de disponer de datos de expresión de varias muestras del mismo tipo de tejido, para el cálculo se usó la media aritmética de todas las muestras pertinentes. LMA: leucemia mieloide aguda; CM: cáncer de mama; CCC: carcinoma colangiocelular; LLC: leucemia linfocítica crónica; CRC: cáncer colorrectal; CVB: cáncer de vesícula biliar; GBM: glioblastoma; CG: cáncer gástrico; CHC: carcinoma hepatocelular; CECC: carcinoma epidermoide de cabeza y cuello; MEL: melanoma; LNH: linfoma no hodgkiniano; CPNMaden: adenocarcinoma de pulmón amicrocítico; CPNMotro: muestras de CPNM que no pueden ser asignadas inequívocamente a CPNMaden o CPNMepiderm; CPNMepiderm: cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide; CO: cáncer de ovario; CE: cáncer de esófago; CPc: cáncer de páncreas; CPr: cáncer de próstata;

CCR: carcinoma de células renales; CPM: cáncer de pulmón microcítico; CVU: carcinoma de vejiga urinaria; CUE: cáncer de útero y endometrio.

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
1	RPRSLQCVSL	LLC		CPr
2	VPGSDPARYEFL	CHC, CUE	CVB, CG, CECC, CPNMaden o, CPNMepider m, CO, CE, CPM	MEL, CVU
3	MPYVVLTA	CPNMepiderm, CPM	CPNMaden	CCR
4	GPKKFIVKL			CPr
5	LPSLSHCSQL	LMA, CM, LNH, CE, CVU	CVB, CECC, CPNMaden o, CPNMepider m, CO, CCR, CPM	MEL, CUE
6	LPLNSSTSL	CM, CHC, CCR	CCC, CRC, CG, CECC, MEL, LNH, CPNMaden o, CO, CE, CPc, CVU, CUE	CVB, CPNMotro, CPNMepiderm , CPM
7	RPSQLAPATL	LMA, CG, CHC, CECC, MEL, CPNMaden o, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CVU, CUE	CVB	CPM
8	MPKTNLSKM	LMA, CG, CHC, CECC, MEL, CPNMaden o, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CVU, CUE	CVB	CPM
9	RPDSRLLEL	CG, CECC, CPNMepiderm, CO, CVU	CHC, MEL, CPM	CVB
10	SPMEAELVRRIL	CG, CECC, CPNMepiderm, CO, CVU	CHC, MEL, CPM	CVB

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
11	APLPRPGAV	CG, CECC, CPNMepiderm, CO, CVU	CHC, MEL, CPM	CVB
12	LPNTGRIGQLL			CPr
13	LPNTGRIGQL			CPr
14	AVHEIGHSL	CHC, CCR	CCC, CG, MEL, LNH, CPNMadenos, CO, CPc, CUE	CRC, CVB, CECC, CPNMotro, CPNMepiderm , CE, CPM, CVU
15	KPGFNISIL	CO		CM
16	FPAPPAHWF	CO		CM
17	SPAAPLSPASSL			CVU
18	MALSVLRLAL			LMA
19	WPRLPGAGL	CG, CHC, CPNMepiderm, CPc, CPM, CVU, CUE	CVB, CECC, CE	MEL
20	MVLGIGPVL			CPr
21	APSRLLEL	CCC, CRC, CVB, MEL, CPM		CHC
22	LPQLKPAL	CM, CPNMepiderm	CE	CECC
23	VPRPTSTVGL		MEL	
24	VPRPTSTVGLFL		MEL	
25	RPQGAVGGL	CVB	CHC	
26	SPSFSSTLLSL	CM, CVB, CPM	CHC, MEL	
27	RIRVTSEVL	CHC, MEL, CUE	CM, CPr	
28	LPAPTSLVL		GBM	
29	APLRVHITSL	CHC	CCC, CPNMadenos, CO	
30	YPGFTKRL	CG, CECC, MEL, CPNMadenos, CPNMepiderm, CE, CPc, CCR, CPM	CM, CCC, CRC, CVB, CHC, CO, CVU	
31	RPGPSDPAA	CPNMadenos, CUE	CCR	
32	APMAPGRSPL	CM	CUE	
33	LPRGLSPARQL	CM	CUE	
34	APMAPGRSP	CM	CUE	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
35	APLPPPRAL		GBM	
36	RPFSREMDL		LMA	
37	LPPPRALTL		GBM	
38	RPSFPNLTsf		LMA	
39	QPRPSSEKI	LMA, GBM	CPM	
40	FPRTVKHIDAAL	CRC, CG, CPNMadeno, CPc, CVU	CECC, CPNMepiderm, CE	
41	MPAGGGPRSL	CCC, CHC, LNH, CUE	LLC	
42	APLKMLAL		LNH	
43	APTPRPKVL	CPr, CUE	CM	
44	SPSQTVQRAV		LNH	
45	TRPWSGPYIL		MEL	
46	QPISGNPVTL	LNH	LLC	
47	RPRQTGALM		LMA	
48	RPRYSIGL	CPr, CUE	CM	
49	APEKARAFL	CVB, CHC, CECC, CPNMadeno, CPNMotro, CPM, CVU, CUE	CRC, CG, CPr	
50	PEKARAFL	CVB, CHC, CECC, CPNMadeno, CPNMotro, CPM, CVU, CUE	CRC, CG, CPr	
51	SPVFYVQTL	CHC	CM, CPr	
52	KEDNPSGHTYTL	CM, MEL, CPNMadeno, CPNMepiderm, CO, CPM	CVB, CHC, LNH	
53	SPRIPFSTF		MEL	
54	VPSCGRSVEGL	CCC, CPNMotro, CVU	CECC, CPNMepiderm, CE, CCR	
55	LPALLRSGL	CVB, LNH, CE	CCC	
56	LPALLRSGLTL	CVB, LNH, CE	CCC	
57	APLLPIRTL		CVU	
58	APLLPIRTLPL		CVU	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
59	KPRTIYSSL	CECC, CPNMepiderm	CPM, CUE	
60	RPYSIYPHGVTF	CCC	CHC	
61	LPRIPFSTF		MEL	
62	KPQSTISGL	CCC	CHC	
63	FPHMATTAF	CPNMotro, CE	CECC	
64	VPRPIFSQLYL	CHC, CO, CPM, CUE	CM, CPr	
65	FPNVYSTLV	CHC	MEL	
66	LPMTVISVL	CPc, CUE	CG	
67	VPVSRPVL	LNH	LLC	
68	FPNEVSVL	CPNMaden	MEL	
69	RPEDGRPRL	CPM	GBM	
70	VPAQRLGLL	CPNMotro	LLC	
71	APFAPLHGGGSL		CPr	
72	APCNGNVAV	CM, CVB, MEL, CO	CPNMaden, CVU	
73	LPVSSPVT		GBM	
74	VPVSHPV		LLC, LNH	
75	HVRPQTNCI	CHC, CPNMotro, CPNMepiderm, CPM	GBM	
76	KPKVESQAL	CPr	CM	
77	QPRLVPGETL		MEL	
78	HPSQESPTL	CPM	CUE	
79	GPASDHPSL	CM, CHC, CO, CUE	CPr	
80	SALPTTISF	CM, CRC, CG, CUE	CHC, CPNMaden	CVB, CECC, MEL, CPNMepiderm , CO, CE, CPM, CVU
81	IAYPSLREAAL	CM, CRC, CG, CUE	CHC, CPNMaden	CVB, CECC, MEL, CPNMepiderm , CO, CE, CPM, CVU
82	DAAHPGPSV		CO	CUE
83	AVSSHNV	CM, CVB, CHC, LNH, CO, CPM, CVU		CPr

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
84	MPMQDIKMI	LMA, CM, CG, LNH, CE, CVU	CVB, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CCR	MEL, CO, CPM, CUE
85	MPMQDIKMILKM	LMA, CM, CG, LNH, CE, CVU	CVB, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CCR	MEL, CO, CPM, CUE
86	ALLLRGVTL	CPNMepiderm, CPM	CPNMadeno	CCR
87	APVGGNVTSSF	LMA, CHC, CECC, MEL, CE	CVB, LNH	CPNMepiderm, CO
88	KPSAVKDSIY	CO	CPr, CPM	CUE
89	FLIPRAGWLAGL			CPr
90	HAIEKAFQL	CRC, MEL, CPNMadeno, CPc	CG, CPNMepiderm, CE, CVU	CECC
91	FPRLVGPdff	CHC, CO	CM, CCC, CRC, CVB, CG, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CE, CPc, CVU, CUE	
92	TSPLPPTV		CCR	
93	SVAIAHGVF	CRC	CPM	
94	LPMSKRQEY	CM, CRC, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CVU	CPM, CUE	
95	RTKEEINEL	CECC, CPNMotro, CPNMepiderm, CPc, CPM	CM, CVB, MEL, CPNMadeno, CO, CVU	
96	QPSLVQAIF	MEL	LMA	
97	LPPGTQIQI	CPM	GBM	
98	FPCSALLACF	CM	CCR	
99	MPVSAFTVI	CRC, CPNMepiderm, CO, CVU, CUE	CM, CCC, CVB, CG, CECC, CPNMadeno, CE, CPc	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
100	TPIPFDKILY	CRC, CPNMepiderm, CO, CVU, CUE	CM, CCC, CVB, CG, CECC, CPNMadenos, CE, CPc	
101	KPGLPGLK	CRC, CPNMepiderm, CO, CVU, CUE	CM, CCC, CVB, CG, CECC, CPNMadenos, CE, CPc	
102	MAGPAIHTAPM	CPM	GBM	
103	REPIMKADML	CM, MEL, CPNMadenos, CPNMepiderm, CO, CPM	CVB, CHC, LNH	
104	RPLPNSVIHV		CHC	
105	RPRYETGVCA	CRC, CG, CPc	CECC, MEL, CO, CE, CVU	
106	APFHIDRLF	CPNMepiderm, CPc, CUE	CG	
107	GQRLESPGGAA	GBM	CPM	
108	APRGSPPI	LNH	LLC	
109	LPRALMRST		LNH	
110	YPSSPASAV		CHC	
111	YPLQQTENVY	GBM	CCR	
112	YPSPLNKHSF	GBM	CCR	
113	KPHLDRRGAVI		CVB, CHC	
114	FVPPSGPSNPM		MEL	
115	KTKSLAQQL	CVB, CG, CPNMadenos, CPNMotro, CPc	CCC, CECC, CPNMepiderm, CE, CVU	
116	RSYQHSLRL	CVB, CG, CPNMadenos, CPNMotro, CPc	CCC, CECC, CPNMepiderm, CE, CVU	
117	IPHQRSSL	CPr	LMA	
118	NPERHKPSF		LMA, CO, CCR, CUE	
119	KATEYVHSL	GBM, MEL, CO, CPM, CVU	LMA, CUE	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
120	TVRPKNAAL	GBM, MEL, CO, CPM, CVU	LMA, CUE	
121	GPFQRAAL		CUE	
122	KPRTPFTTAQLL		CUE	
123	RPRLRDLPAL	CVB, LNH, CE	CCC	
124	KTIDGHINL	LMA, CM, CCC, CRC, CVB, GBM, CG, CHC, CECC, MEL, CPNMadenos, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CVU, CUE	LLC, LNH, CPM	
125	SPAKQFNIY	LMA, CM, CCC, CRC, CVB, GBM, CG, CHC, CECC, MEL, LNH, CPNMadenos, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CVU, CUE	LLC, CPM	
126	MPREDAHF		MEL	
127	KSKQVITLL		MEL	
128	SPPATLFLFLL	CCC	MEL	
129	MTLPATTLTL		LNH	
130	GAYDKARYL	CHC, CPr	CM	
131	MPFRNIRSIL	CM, CO, CPM	CCC, CHC	
132	LPRLPVGSLV	CM, CRC, CVB, CG, MEL, LNH, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CUE	CECC, CPNMadenos, CE, CPc	
133	LPELPTTLTF	CM, CRC, CVB, CG, CECC, MEL, LNH, CPNMepiderm, CO, CUE	CPNMadenos, CE, CPc	
134	VAAAARLTL		MEL	
135	MPRLLRLSL	CVB, CHC, LNH, CO, CPM, CUE	CM	
136	QPDHAGIFRVF	CPNMotro, CE	CECC	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
137	SPQLSYFEY	CG, CPNMaden, CPNMotro, CPc, CVU	CCC, CECC, CPNMepiderm, CE	
138	VPFNLITEY	CHC	MEL	
139	LVILQHQAM	CPc, CUE	CG	
140	TPFPDIHWF	CPNMaden	MEL	
141	YGPYGSWSGW	LNH	CECC, MEL	
142	HPFKMKWQY	CE	CCR	
143	YPMIPPAQL	CPM	GBM	
144	RPVQGIPTY		MEL	
145	VPAQRLGLLL	CPNMotro	LLC	
146	SPTRGSEF		GBM	
147	HVAQPAVVL	LNH	LLC	
148	KPHLIYRQ	CM, CO, CUE	CPM	
149	SPSSVFTSK		CM	
150	APLHGGGSL		CPr	
151	QPTWNTQTRL	LNH	LLC	
152	SSASFSELFRH		GBM	
153	QPVHSLCSA		CG, CPc	
154	RPPPSRRAVL		GBM	
155	APIPRLIEG	CHC, CE	CECC	
156	GSRPVTGSV	CM, CVB, MEL, CO	CPNMaden, CVU	
157	RPVTGSVC	CM, CVB, MEL, CO	CPNMaden, CVU	
158	SVPVATVEL		LNH	
159	TPMTVPRI	LNH	LLC	
160	IPVSHPVLTf		LLC, LNH	
161	ASKILETSL		MEL	
162	IPIRVDQNGAF	LMA, GBM	LLC	
163	FRYPNGVSL		CHC	
164	RAAGRRLQL		CHC	
165	RPSKEMQVTI	CCC, CG	CPc	
166	YAYTSRVIL	LMA	LLC, LNH	
167	NVNPARKGL	CO, CE	LMA	
168	SPSGQRDVSL		MEL	
169	RPFSVSSISQL		MEL	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
170	APEGKRLGF		MEL	
171	LPLGGHKSL		MEL	
172	SAQSLHPVL		GBM	
173	VIINNPISL		MEL	
174	IPVTSSVTL		MEL	
175	AAFPHKIIF		CCR	
176	QPLDICHSF	CCC, CVB, CG, CHC, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CVU	CRC, MEL	
177	VWEPQGSSRSL		CUE	
178	VPYYPRANL	CRC, CG, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CO, CE, CVU	CVB	
179	PRVRLLLL	LMA	CPM	
180	RLRDYISSL	LNH	LLC	
181	LPVSPARAL	CCC, CRC, CVB, GBM, CG, MEL, LNH, CPNMadeno, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CPc, CVU, CUE	CM, CECC, CE	
182	RPLPVSPARAL	CCC, CRC, CVB, GBM, CG, MEL, LNH, CPNMadeno, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CPc, CVU, CUE	CM, CECC, CE	
183	VPRRPARAL		GBM	
184	KIIASGNHL	CM, LLC, LNH, CCR	CVU	
185	RPVLTASSF	LNH	LLC	
186	VPLPAGGGTVLT		CPM	
187	APPPPPPPF	LMA, LLC, LNH	CPr	
188	HAAASFETL	MEL	LLC, LNH	
189	QPQCSTHIL		CHC	
190	RLAHVRARL	CM, CHC, CO	CPr	
191	KPKAVKPKAA	LLC	LNH	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
192	IPFADVKSF	CPNMepiderm	CPNMadeno, CPNMotro	
193	LPALKEEAF		CPr	
194	HPNKKASL		CM	
195	NPIFGRKEL		CUE	
196	RPSGTAGAAL		GBM	
197	RPSGTAGAALLA		GBM	
198	LPSPAHAFRAL	CHC, MEL, LNH, CO, CPc, CUE	CVU	
199	SPFWIHQA		LMA	
200	EPFHLLVSY	MEL	LLC, LNH	
201	LPIARVLTV		CM	
202	SPSREASAL		LMA	
203	KPRGPIDI	MEL	CPr	
204	FPYSGDKILV		GBM	
205	LPPALLTTV		GBM	
206	TPRIGPKVSL		GBM	
207	VPSDITTA		GBM	
208	RNRQVATAL	LMA	CCC	
209	KIEQIRAVL	CCC, CVB, CG, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CPc, CVU	CE	
210	IPENRVVSY		CRC	
211	IPDTIASVL		MEL	
212	VPYAAQAAL	CRC, CVB, CPM, CUE	CHC	
213	RPYQDAPVA	LNH, CCR	GBM	
214	LPLKFFPII	CCC, CVB, CG, CHC, CPNMadeno, CPc, CPM	CO	
215	IPVAIKEL		GBM	
216	LPWEQNEQV		CHC	
217	SPGDKRLAAYL		CHC	
218	VQRTPPPI	CCC, CRC, CVB, CG, CPc	CCR, CPM	
219	VPHTGRYTCL		MEL	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
220	RPAPGPAPFV	CVB, CECC, MEL, CPNMadeno, CE, CPc, CVU, CUE	CRC, CG	
221	LPQRPNARL	CCC, CVB, CG, CPNMadeno, CPNMotro, CPNMepiderm, CPc, CVU	CECC, CE	
222	MLKTTLTAF		CHC	
223	KAHVRIEL	CHC	CRC	
224	SPIIHSILL	CM, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CO, CUE	CPM	
225	SPIIHSIL	CM, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CO, CUE	CPM	
226	APGGSSRSSL		LMA	
227	RPGTGQGGL		LMA	
228	RPTAASQSRAL		LMA	
229	FPNAGPRHLL	LNH	LLC	
230	DVIDDIISL		MEL	
231	SPITLQAL		CHC	
232	TAYPSLRLL	CECC, MEL, CPNMepiderm	CPM	
233	MAYDRFIAI	CM, CVB, CHC, CECC, MEL, CPNMadeno, CPNMotro, CPNMepiderm, CPc, CPM	LNH	
234	HPRAPGEQQRL	CHC	CRC	
235	AQNPAGTAL		MEL	
236	TPELKSSIL		CHC	
237	LPRAGGAF	CCC, CG, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CPc, CVU	CE	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
238	LPRAGGAFLM	CCC, CG, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CPc, CVU	CE	
239	VLPRAGGAFLM	CCC, CG, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CPc, CVU	CE	
240	RVMLPKAAL	CM, CCC, LNH, CPNMepiderm, CO, CE, CPM, CVU, CUE	CVB	
241	LPKAALLV	CM, CCC, LNH, CPNMepiderm, CO, CE, CPM, CVU, CUE	CVB	
242	IPETASVVAI	MEL	LLC, LNH	
243	MARTGGMVVI		CVU	
244	VPAHLVAA		CCR	
245	GPVPSPLAL		LLC	
246	RPILKEQSSSSF		CECC	
247	SPVGVGQRL	GBM	CPM	
248	KPYDGIPAS		GBM	
249	SPRSGVLL	CO	CUE	
250	APAAPAAVPS	CRC, GBM, CG, CECC, CPM	CPNMadeno, CPNMepiderm	
251	MPVDSFNSM	CCC, CVB, CPNMadeno, CUE	CRC	
252	QPENSLEGISL	CCC, CVB, CPNMadeno, CPNMotro, CPc, CCR, CUE	CRC	
253	MPVDSFNSML	CCC, CVB, CPNMadeno, CUE	CRC	
254	RVIQGTTL	LNH	LLC	
255	VPSHWMVAL	LLC	LNH	
256	SPVPSHWMVAL	LLC	LNH	
257	APYGTLRKS		CCC	
258	SVIGPNSRL	LNH	LLC	
259	VPMPGVQAV	CRC	CUE	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
260	LVQSSRSEV	CE	CECC	
261	SPSTSRTPL		GBM	
262	SPSTSRTPLLSSL		GBM	
263	SQRPPATSQA	CO	LNH	
264	APRPGNWIL	MEL, CPNMepiderm, CO, CCR, CPM	CUE	
265	FPRKPYEGRV		MEL	
266	KPYEGRVEI		MEL	
267	MPVPGILL		MEL	
268	EPLSVTASY	CVB, CPM	CHC	
269	FTVSSSSAM		CPc	
270	SPRGTTSTL		CPc	
271	SPTPVFTTL		CPc	
272	SSPRGTTSTL		CPc	
273	TDTPSTTPTTI		CPc	
274	KPIRTGISPLAL		CHC	
275	IPAPQGAVL		CPNMotro	
276	RPVWDVRS	CPNMaden	CECC	
277	MPPLLIVAF	CVU	CM	
278	LIAARGSLVL	GBM, CHC, MEL, CO	CPM	
279	APADEPRTVL	CM, CCC, CRC, CVB, CG, CECC, LNH, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CPM, CVU, CUE	GBM	
280	LPRAFLQSL	CM, CCC, CRC, CVB, CG, CECC, LNH, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CPM, CVU, CUE	GBM	
281	NPRSPPATM	CHC, CUE	CVU	
282	AVRLPTPNL	LMA		
283	RPQPGWRESL	CVB, CPM		
284	RPSAPRGPP	CRC		
285	RITWKGLLL	CCC		

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
286	APARPAAAF	MEL, CO		
287	SPIPRPLFL	CM, CPM		
288	LHAMNSLSAM	CCC, CO, CPM, CVU, CUE		
289	LPYEKVSRL	CCC		
290	RPTHPLRSF	GBM		
291	SPSKSLEM	LLC, CRC		
292	LPMTHRLQL	CCC		
293	FPYDKPLIM	CCC, CVB, CPNMadeno		
294	VPKPAIPSSSVL	GBM, CPNMepiderm, CPM		
295	HPRWIEPTVM	CPr		
296	SPLLMQRTL	LMA, LLC		
297	FPIKYVNDP	CCC, CVB, CPNMadeno		
298	RVLLRWISL	GBM		
299	SPFSGGPVSF	CCR		
300	HPYSDLADV	CPM		
301	FPAFLEAM	CPM		
302	IPIDQILNSF	CPM		
303	RPPPPCIAL	CPM		
304	SPLIGDFPAF	CPM		
305	AASPVGSAL	CHC		
306	RPFPLALL	CRC		
307	RPHQKGWLSI	CHC		
308	RPDVVRTLL	CCC, CECC, CE		
309	FAFYGGKSL	GBM, CHC, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CE, CPM, CVU		
310	SPGWAQTQL	CRC, CG, CPNMadeno, CPc, CCR		
311	APRLALDPDAL	GBM, CPM, CUE		
312	SPSLQSSRESL	CM, CCC, CRC, CVB, GBM, CG, CECC, MEL, LNH, CPNMadeno,		

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
		CPNMepiderm, CE, CPc, CPM, CVU, CUE		
313	VPLSSYVSI	GBM		
314	IALMKLAGPL	CCC, CVB, CG, CHC, CO, CPc, CPM		
315	APVVFPAL	CPM		
316	NPREPEKSL	CRC, CVB, CG, CPc		
317	MPYNSAHHCVV	LLC, CO		
318	TPISNTGVL	LLC, LNH		
319	RPLDTFRVL	CPr, CVU		
320	APMHIDRNIL	CHC		
321	QPQQPGFFL	LMA		
322	RAVPVGSGSL	CPM		
323	TPHGITDIL	CG		
324	LPAPLRISL	GBM		
325	SPRSNPVRL	LNH		
326	IPPFTQRVF	CECC, CPNMepiderm		
327	GPRTTQSSVL	LLC, LNH		
328	LPLHRGDLVI	LLC		
329	QPANFIVLL	CVB, CG, CPc		
330	RPFSAIAEL	CCC		
331	SPDSAILKL	CPr		
332	SPYAGSTAF	CM		
333	SVLPRALSL	CPM		
334	YPLSLALHF	CPM		
335	VPPQNPRPSL	LMA		
336	YPLQGPGLLSV	CPNMotro, CPM		
337	IPTSRVITL	CHC, LNH		
338	MPATPSLKV	CCC, CRC		
339	GPQRTTSV	LNH		
340	APEPRAALL	MEL		
341	LPRSPPLKVL	CVB, LNH		
342	RPRPPKVL	CHC, CPNMotro, CPNMepiderm		
343	RPRPPKVLGL	CHC, CPNMotro, CPNMepiderm		

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
344	VPYPSPTCV	CHC, CPr		
345	SAAPPGASL	CHC, CPr		
346	IPMPRITWL	CVU		
347	SPLEKINSF	MEL, CPM		
348	HPAPPVTSA	CECC, CO, CE, CVU		
349	QPRDGWPMML	CECC, CO, CE, CVU		
350	RPKSTLMNF	CECC, CO, CE, CVU		
351	SPYADIIPSA	CM, MEL		
352	LPAFSKIGGIL	CPM		
353	KPRATWTL	CECC, CO		
354	APAKDARASL	GBM		
355	APKTSFIAA	CRC, CG, CPNMadeno, CPc		
356	RPFLRLPSL	CRC, CECC, CE		
357	LPPHIFAI	MEL		
358	APSMLRKNQL	CM, GBM, MEL, CPNMadeno, CE, CPM	CVB, CVU	CHC
359	SPRRLVELAGQSL	LMA, CM, CG, CHC, LNH, CE, CVU	CVB, CECC, CPNMadeno, CPNMepiderm, CCR	MEL, CO, CPM, CUE
360	SPASRSISLL	LMA, CG, CECC, CO, CE	LLC, LNH	CCR
361	SPYGSDRLVQL	LNH	LLC	
362	KPMLPPAAF		CUE	
363	KPRTPFHTTA		CUE	
364	KPRTPFHTTAQL		CUE	
365	RPKHFLQML	CECC, LNH, CPNMepiderm, CE	CO	
366	SPTLRQLDL	CHC	LNH	
367	APQVHIFSL	GBM, CO	CCC	
368	NPASRLTAL	CPr, CUE	CM	
369	RPYGCVLRAA	LMA, CCC, CVB, CG, CECC, CO, CE	LLC, LNH	CCR
370	AAHEFGHVL	CHC, CPNMotro, CO, CCR, CPM	CM, CCC, CRC, CVB, CG, CECC, CPNMadeno,	

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión de genes en las muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
			CPNMepiderm, CE, CPc, CVU, CUE	
371	APRSPGQVTPRGL	CHC, CPNMaden, CPNMepiderm, CPc, CPM	CRC, CVB, CG, CCR	
372	SPSSASLTL	CVB, CG, CHC, MEL, CPNMaden, CPNMotro, CPc, CUE	CECC, CPNMepiderm, CO, CE, CPM, CVU	
373	LPKPDLPQLI	CM, CHC	CPr	
374	KPRNMTGLDL	LNH	LLC	
375	LPRGVLEGL	CM, CCC, CRC, CVB, CG, CECC, LNH, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CPr, CPM, CVU, CUE	GBM	
376	FPQVGRTAL	LLC		
377	SPFSKRIKL	LMA, LLC, LNH		
378	SPRQPRLDF	CPNMepiderm, CPM		
379	GPRQVLFPL	GBM		
380	SPYPGSAAF	CM, CG		
381	APRPRLLLL	CCC, CVB, MEL		
382	RPGPQRTTSV	LNH		
383	KPRATWTLKL	CECC, CO		

Tabla 9b: Grados de expresión. La tabla enumera los péptidos derivados de genes que aparecen sobrepresentados en diverso grado en los tumores con respecto a un grupo de tejidos normales, a saber: extremadamente sobrepresentados (+++), mucho (++) y más (+) en comparación con un grupo de tejidos normales. El valor de referencia (basal) de esta puntuación se calculó con mediciones de los siguientes tejidos normales relevantes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, vía biliar, células sanguíneas, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebro, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, cabeza y cuello, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, nervio, glándula paratiroidea,

páncreas, hipófisis, peritoneo, pleura, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroidea, tráquea, uréter y vejiga urinaria. En caso de disponer de datos de expresión de varias muestras del mismo tipo de tejido, para el cálculo se usó la media aritmética de todas las muestras pertinentes. LMA: leucemia mieloide aguda; CM: cáncer de mama; CCC: carcinoma colangiocelular; LLC: Leucemia linfocítica crónica; CCR = cáncer colorrectal; CVB: cáncer de vesícula biliar; GBM: glioblastoma; CG = cáncer gástrico; CHC: carcinoma hepatocelular; CECC= carcinoma epidermoide de cabeza y cuello; MEL = melanoma; LNH: linfoma no hodgkiniano; CPNMaden: cáncer de pulmón amicrocítico – adenocarcinoma; CPNMotro: muestras de CPNM que no se pueden asignar inequívocamente a los tipos CPNMaden o CPNMepiderm; CPNMepiderm: cáncer de pulmón amicrocítico epidermoide; CO: cáncer de ovario; CE = cáncer de esófago; CPc = cáncer de páncreas; CPr = cáncer de próstata; CCRn = carcinoma de células renales; CPM: cáncer de pulmón microcítico; CVU: carcinoma de vejiga urinaria; CUE: cáncer de útero y endometrio.

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión del gen en muestras tumorales		
		Sobreexpresado (+)	Muy sobreexpresado (++)	Extremadamente sobreexpresado (+++)
448	TVYGEPRKL	CM, CCR, CG, CUE	CHC, CPNMaden	CVB, CECC, MEL, CPNMepiderm, CO, CE, CPNM, CVU
449	RPKTSVNLISSL	CHC, LNH, CCRn	CCC, CVB, CG, MEL, CPNMaden, CO, CE, CPc, CVU, CUE	CCR, CECC, CPNMotro, CPNMepiderm, CPNM
450	SAAARALLP	CHC, MEL, CCRn, CPNM	CM, CCR, CVB, CG, CECC, CPNMaden, CPNMepiderm, CO, CE, CVU, CUE	CCC, CPc
451	VPILPLNHAL	CM	CUE	
452	QPVKKNTL	CHC, CUE	CCRn	
453	APALPGQVTI	CCC, CCR, CVB, CHC, MEL,	CM, GBM, CO, CPNM, CVU, CUE	

		CPNMadeno, CPNMotro, CPNMepiderm, CPc, CPr		
454	SPDPAHLESL	CM, CG, CPNMadeno, CE, CPc, CUE	CVB, CHC, CECC, MEL, CPNMepiderm, CO, CPNM, CVU	
455	FPVQATIDF	CM, CCR, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CVU	CPNM, CUE	
456	VPVSHPVLT		LLC, LNH	
457	RPPLSQRHTF	LNH	LLC	
458	VPIPTHYFVVL		CCRn	
459	SPAPWRPWI	CM, CPNMepiderm, CO, CE, CPr, CVU, CUE	CPNM	
460	APLMPLGKTL	CVB, CG, CPNMadeno, CPNMotro, CPc, CUE	CCC, CECC, CPNMepiderm, CE, CVU	
461	MPHLGPGILL		MEL	
462	MPLLADVRL		MEL	
463	LPTDLFNSVM		MEL	
464	VPFVPRTSV	CM, CG, CECC, MEL, LNH, CPNMadeno, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE, CPc, CCRn, CVU, CUE	CCC, CCR, CVB	
465	VPKSLPYVL	CECC, CPNMepiderm, CE	LMA, CHC, LNH	
466	SPMEAILVSRL	CCR, CPNMadeno, CPNMepiderm, CPNM	CCRn	
467	VPRNQDWLGVSRL		MEL	
468	LPSLHVLVL		MEL	
469	LPLDTRTSI	LNH	LLC	

470	RPNGEVKSEL	CCRn, CPNM	CCR	
471	LPLLAGTLLL		CUE	
472	LPMPAITWY		MEL	
473	LPGEREAAL		MEL	
474	VPKADLLTL		MEL	
475	IPLEIQKL		CHC	
476	EPNPVEEIF	CCC, CCR, GBM, CG, CECC, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CE	CM, CVB, MEL, CPNMadeno, CPc	
477	NPVPVITWYKDNRL		MEL	
478	APKFISPASQL	CCRn, CPNM	CCR	
479	APHAGGALL	CVB, CECC, MEL, CPNMadeno, CPNMepiderm, CO, CPNM, CUE	LNH	
480	VPAAPTKAL	CVU	GBM	
481	SPARALLLALA	CCC, CCR, CVB, GBM, CG, MEL, LNH, CPNMadeno, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CPc, CVU, CUE	CM, CECC, CE	
482	QPSLKKIIL	CCC, LLC, CVB, CG, CHC, CPNMepiderm, CPc	CPNMadeno, CUE	
483	KPAAAGVKKVA	LLC	LNH	
484	LPASAEPKGTM	CCC, CCR, CVB, CG, CHC, CECC, CPNMadeno, CPNMotro, CPNMepiderm, CO, CPc	CE, CVU	
485	LPLKTKVFA	CCC, CPNMadeno, CPNMotro, CPc, CCRn	CM	

486	TPTRPLPSA	CCC, CCR, CVB, CG, CPc	CCRn, CPNM	
487	IPWFIKTAF		MEL	
488	LPLGGLPLLI	LNH	LLC	
489	WPNHIMLV	CM, MEL, CO	CPr	
490	APRGPAQGEAA		LMA	
491	MPEADLKRIF		MEL	
492	IPFSVDEI	CCC, CVB, CPNMaden, CUE	CCR	
493	LPLQQYKLV	CCR, GBM, CG, CECC, CPNMepiderm, CPNM	CPNMaden	
494	LPLRAVNLNL	CVB, GBM, MEL, CPNMepiderm, CO, CE	CPNM	
495	SPSYTQASL		CM	
496	MPAVSGPGPLF		CPr	
497	YVVKPLHPF	CPNMotro, CPNMepiderm	CPNMaden	
498	RPQPQPRPAL	LLC, LNH, CO, CE, CVU	CCC, CVB, CECC	
499	QPVLPSPAC		MEL	

EJEMPLO 3

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

A fin de recabar información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, los inventores llevaron a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de linfocitos T basado en estimulaciones reiteradas de linfocitos T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo los inventores han podido demostrar la inmunogenicidad de TUMAP restringidos a HLA-B*07 de la invención, lo cual demuestra que estos péptidos son epítomos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en humanos (véase la Tabla 10a y 10b).

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-B*07 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 / estreptomina 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, las 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 446) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID N.º 447), respectivamente.

Placas de 96 pocillos se tapizaron con 800.000 microperlas / 200 μ l 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 μ l. Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1×10^6 linfocitos T CD8+ con 2×10^5 microperlas recubiertas y lavadas en 200 μ l 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 derivados de leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de vesícula biliar, glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, melanoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón (incluido el adenocarcinoma de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón epidermoide

amicrocítico y el cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga urinaria y cáncer de útero y de endometrio.

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 las Figuras 3A a 3G se muestran a título de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de dos péptidos de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados de 58 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 10a y 10b.

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

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]
388	SPSVSQLSVL	++++
389	APLPRPGAVL	++
390	SPRMSGLLSQT	+++
391	APRPASSL	+
392	GPQPWHAAL	++
393	APAAWLRSA	+++
396	VPDVAQFVL	++
398	SPASRSISL	+
399	NPFYPEVEL	+
405	LPFDGPGGIL	++++
406	LPDGSRVEL	++++
407	FPRLVGPDF	+++
408	YPKDIYSSF	++
410	SPRSWIQVQI	+
411	IPNWARQDL	++++
414	KPSESIYSAL	++
415	LPSDSHFKITF	++
418	RPMTPTQIGPSL	+
419	SPMWHVQQQL	++++

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]
420	SPRWLPVSL	++++
423	SPRVYWLGL	++++
425	YPRGNHWAVGHL	++
427	VPSSRILQL	+++
429	RPRALRDLQL	++
430	RPRALRDLQLL	+++
433	IPEPSAQQL	+
437	FPYPYAERL	+++
440	YPRITITPGM	+
443	VPDGVSKVL	+++
445	RPAATAVISL	+

Tabla 10b: Inmunogenicidad in vitro de los péptidos HLA de clase I de la invención. Resultados a título de ejemplo de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por el solicitante de los péptidos de la invención.

<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]
1	RPRSLQCVSL	+
3	MPYVVLTA	+
4	GPKKFIVKL	+
5	LPSLSHCSQL	++
6	LPLNSSTSL	+
9	RPDSRLLEL	+++
12	LPNTGRIGQLL	++
17	SPAAPLSPASSL	+
21	APSRLEL	+
23	VPRPTSTVGL	++
24	VPRPTSTVGLFL	+
26	SPSFSSTLLSL	+
33	LPRGLSPARQL	++
38	RPSFPNLTSF	+
45	TRPWSGPYIL	+
48	RPRYSIGL	+
49	APEKARAFL	+
51	SPVFYVQTL	+
53	SPRIPFSTF	+
56	LPALLRSGTL	+++

SEQ ID N.º	Secuencia	Pocillos positivos [%]
59	KPRTIYSSL	+
61	LPRIPFSTF	++
64	VPRPIFSQLYL	+++
68	FPNEVSVVL	++
361	SPYGSDRLVQL	+
364	KPRTPFETTAQL	+
365	RPKHFLQML	+
366	SPTLRQLDL	++

EJEMPLO 4

Síntesis de péptidos

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

EJEMPLO 5

Ensayos de unión a MHC

Los péptidos candidatos para los tratamientos a base de linfocitos T acordes con la presente invención fueron sometidos a ensayos para determinar su capacidad de unión a las moléculas del MHC (afinidad). Se produjeron complejos individuales de péptidos-MHC por medio del intercambio de ligandos facilitado por UV, técnica en la cual un péptido sensible a los rayos UV es escindido por la irradiación con tales rayos y se intercambia por el péptido de interés que es analizado. Solo aquellos péptidos candidatos que se unen y estabilizan de forma efectiva las moléculas del MHC a las que se acoplan impiden la disociación de tales complejos MHC. Para determinar el rendimiento de la reacción de intercambio se efectuó un ELISA basado en la detección de la cadena ligera ($\beta 2m$) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo siguiendo la descripción general de Rodenko y cols. (Rodenko et al., 2006).

Placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) se incubaron toda la noche con estreptavidina 2 µg/ml en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces y se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con un tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Los monómeros replegados de HLA-A*02:01/MLA-001 sirvieron como patrones, abarcando el intervalo de 15 a 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC resultantes de la reacción de intercambio facilitada por los UV se diluyeron 100X con tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con una solución de anti-β2m conjugado con HRP 2 µg/ml durante 1 h a 37 °C, se lavaron de nuevo y se procedió a su detección con una solución de TMB cuya reacción se detuvo añadiendo NH₂SO₄. La absorción se midió a 450 nm. Por norma general, para la creación y producción de anticuerpos o de fragmentos de los mismos, o de receptores de linfocitos T o fragmentos de los mismos se prefieren los péptidos candidato que muestran un alto porcentaje de intercambio (preferentemente superior al 50%, aún más preferentemente superior al 75%), puesto que presentan una afinidad suficiente hacia las moléculas del MHC que evita la disociación de los complejos MHC.

Tabla 11: Puntuaciones de unión a las moléculas del MHC de clase I. Según el porcentaje del intercambio de péptidos, la unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I al HLA-B*07 varió entre: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
1	RPRSLQCVSL	++++
2	VPGSDPARYEFL	+++
3	MPYVVLTA	++++
4	GPKKFIVKL	+++
5	LPSLSHCSQL	++++
6	LPLNSSTSL	++++
7	RPSQLAPATL	+++
8	MPKTNLSKM	+++
9	RPDSRLLEL	++++
10	SPMEAELVRRIL	++++
11	APLPRPGAV	++++
12	LPNTGRIGQLL	++++
13	LPNTGRIGQL	+++
14	AVHEIGHSL	+++
15	KPGFNISIL	++++
16	FPAPPAHWF	++++
17	SPAAPLSPASSL	++++
18	MALSVLRAL	++
19	WPRLPGAGL	+++
20	MVLGIGPVL	++++
21	APSRLEL	++++
22	LPQLKPAL	++++
23	VPRPTSTVGL	+++
24	VPRPTSTVGLFL	++++
25	RPQGAVGGL	+++
26	SPSFSSTLLSL	++++
27	RIRVTSEVL	+++
28	LPAPTSVL	++++
29	APLRVHITS	++++
30	YPGFTKRL	+++
31	RPGPSDPAA	+++
32	APMAPGRSPL	++++
33	LPRGLSPARQL	+++
34	APMAPGRSP	+++
35	APLPPPRAL	+++
36	RPFSREMDL	+++
37	LPPPRALTL	+++
38	RPSFPNLTSF	++++
39	QPRPSSEKI	+++
40	FPRTVKHIDAAL	++++
41	MPAGGGPRSL	++++
42	APLKMLAL	++++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
43	APTPRPKVL	++++
44	SPSQTVQRAV	++++
45	TRPWSGPYIL	+++
46	QPISGNPVT	+++
47	RPRQTGALM	++++
48	RPRYSIGL	+++
49	APEKARAFL	+++
50	PEKARAFL	+++
51	SPVFYVQTL	++++
52	KEDNPSGHTYTL	+++
53	SPRIPFSTF	++++
54	VPSCGRSVEGL	+++
56	LPALLRSGLTL	++++
59	KPRTIYSSL	++++
60	RPYSIYPHGVT	++++
61	LPRIPFSTF	++++
62	KPQSTISGL	+++
63	FPHMATTAF	+++
64	VPRPIFSQLYL	++++
65	FPNVYSTLV	++++
66	LPMTVISVL	++++
67	VPVSRPVL	++++
68	FPNEVSVVL	++++
69	RPEDGRPRL	+++
70	VPAQRLGLL	++++
71	APFAPLHGGGSL	+++
72	APCNGNVAV	+++
73	LPVSSPVT	++++
74	VPVSHPVL	++++
75	HVRPQTNCI	+++
76	KPKVESQAL	++++
77	QPRLVPGETL	++++
78	HPSQESPTL	+++
79	GPASDHPSL	+++
80	SALPTTISF	+++
81	IAYPSLREAAL	++
83	AVSSHNV	++
84	MPMQDIKMI	+++
85	MPMQDIKMILKM	+++
86	ALLLRGVTL	++
87	APVGGNVTSSF	+++
88	KPSAVKDSIY	++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
89	FLIPRAGWLAGL	++
91	FPRLVGPDPFF	++++
92	TSPLPPTV	+++
93	SVAIAHGVF	++++
94	LPMSKRQEY	+++
95	RTKEEINEL	++
96	QPSLVQAIF	++++
98	FPCSALLACF	++++
99	MPVSAFTVI	++++
101	KPGLPGLK	+
102	MAGPAIHTAPM	++
103	REPIMKADML	++
104	RPLPNSVIHV	+++
105	RPRYETGVCA	++++
106	APFHIDRLF	+++
108	APRGSPPI	+++
109	LPRALMRST	+++
110	YPSSPASAV	++++
111	YPLQQTENVY	+
112	YPSPLNKHSF	+++
113	KPHLDRRGAVI	++++
114	FVPPSGPSNPM	++
115	KTKSLAQQL	+++
117	IPHQRSSL	++++
118	NPERHKPSF	+++
119	KATEYVHSL	+
120	TVRPKNAAL	+++
121	GPFQRAAL	+++
122	KPRTPFETTAQLL	++++
123	RPRLRDLPAL	+++
125	SPAKQFNIY	++
126	MPREDAHF	+
127	KSKQVITLL	+
129	MTLPATTLTL	++
130	GAYDKARYL	++
131	MPFRNIRSIL	+++
132	LPRLPVGSLV	++++
133	LPELPTTLTF	++
134	VAAAARLTL	+++
135	MPRLRLSL	+++
136	QPDHAGIFRVF	++++
139	LVILQHQM	+++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
140	TPFPDIHWF	++++
141	YGPYGSWSGW	++
143	YPMIPPAQL	+++
144	RPVQGIPTY	+++
145	VPAQRLGLLL	+++
146	SPTRGSEF	++++
147	HVAQPAVVL	+++
149	SPSSVFTSK	+++
150	APLHGGGSL	+++
151	QPTWNTQTRL	++++
152	SSASFSELEFRH	+++
153	QPVHSLCSA	++++
154	RPPPSRRRAVL	+++
156	GSRPVTGSV	+++
157	RPVTGSVC	++++
158	SVPVATVEL	++
160	IPVSHPVLT	++
161	ASKILETSL	++
162	IPIRVDQNGAF	+++
164	RAAGRRLQL	++++
165	RPSKEMQVTI	++++
167	NVNPARKGL	++++
168	SPSGQRDVSL	++++
169	RPFSVSSISQL	++++
170	APEGKRLGF	++++
171	LPLGGHKSL	+++
172	SAQSLHPVL	+++
173	VIINNPISL	++
174	IPVTSSVTL	++++
176	QPLDICHSF	++++
177	VWEPQGSSRSL	+++
178	VPYYPRANL	+++
180	RLRDYISSL	++++
181	LPVSPARAL	+++
182	RPLPVSPARAL	+++
183	VPRRPARAL	+++
184	KIIASGNHL	++
185	RPVLTASSF	++++
186	VPLPAGGGTVLT	+
187	APPPPPPPF	++++
188	HAAASFETL	++
189	QPQCSTHIL	++++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
190	RLAHVRARL	+++
191	KPKAVKPKAA	++++
192	IPFADVKSF	++
193	LPALKEEAF	++++
194	HPNKKIKASL	+++
195	NPIFGRKEL	+++
196	RPSGTAGAAL	+++
197	RPSGTAGAALLA	++
198	LPSPAHAFRAL	+++
199	SPFWIHQA	++
201	LPIARVLTV	++++
202	SPSREASAL	+++
203	KPRGPIDI	++
204	FPYSGDKILV	+++
206	TPRIGPKVSL	+++
207	VPSDITTAF	+++
208	RNRQVATAL	+++
209	KIEQIRAVL	+++
210	IPENRVVSY	++
211	IPDTIASVL	+++
212	VPYAAQAAL	++++
213	RPYQDAPVA	++++
214	LPLKFFPII	+
215	IPVAIKEL	++
216	LPWEQNEQV	+++
217	SPGDKRLAAYL	+++
219	VPHTGRYTCL	+++
220	RPAPGPAPFV	+++
221	LPQRPNARL	+++
222	MLKTTLTAF	+
223	KAHVRIEL	++
224	SPIIHSILL	++++
225	SPIIHSIL	+++
226	APGGSSRSSL	+++
227	RPGTGQGGL	+++
228	RPTAASQSRAL	+++
229	FPNAGPRHLL	+++
230	DVIDDIISL	++++
231	SPITLQAL	++++
232	TAYPSLRLL	+++
233	MAYDRFIAI	+++
234	HPRAPGEQQRL	+++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
235	AQNPA GTAL	+
236	TPELKSSIL	+++
237	LPRAGGAF	++++
238	LPRAGGAFLM	++++
239	VLPRAGGAFLM	+++
240	RVMLPKAAL	+++
242	IPETASVVAI	+++
243	MARTGGMVVI	++
244	VPAHLVAA	++
245	GPVPSPLAL	++++
246	RPILKEQSSSSF	++++
247	SPVGVGQRL	+++
248	KPYDGIPAS	+++
249	SPRSGVLL	+++
250	APAAPAAVPS	++
251	MPVDSFNSM	++++
252	QPENSLEGISL	+++
253	MPVDSFNSML	++++
254	RVIQGT TTL	++++
255	VPSHWMVAL	++++
256	SPVPSHWMVAL	++++
258	SVIGPNSRL	++
259	VPMPGVQAV	++++
260	LVQSSRSEV	++++
261	SPSTSRTP L	+++
262	SPSTSRTP LLSSL	++++
263	SQRPPATSQA	++
264	APRPGNWIL	+++
265	FPRKPYEGRV	+++
266	KPYEGRVEI	++++
267	MPVPGILL	+++
268	EPLSVTASY	++
269	FTVSSSSAM	++
270	SPRGTTSTL	+++
271	SPTPVFTTL	+++
272	SSPRGTTSTL	+++
273	TDTPSTTP TTI	++
274	KPIRTGISPLAL	+++
275	IPAPQGAVL	+++
276	RPVWDV RSA	++++
277	MPPLLIVAF	++
278	LIAARGSLVL	+++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
279	APADEPRTVL	+++
280	LPRAFLQSL	++++
281	NPRSPPATM	++++
282	AVRLPTPNL	++++
283	RPQPGWRESL	++++
284	RPSAPRGPP	++++
285	RITWKGLLL	+++
286	APARPAAAF	++++
287	SPIPRPLFL	++++
288	LHAMNSLSAM	+++
289	LPYEKVSRL	+++
290	RPTHPLRSF	++++
291	SPSKSLEM	+++
292	LPMTHRLQL	+++
293	FPYDKPLIM	++++
294	VPKPAIPSSSVL	++++
295	HPRWIEPTVM	++++
296	SPLLMQRTL	++++
298	RVLLRWISL	+++
299	SPFSGGPVSF	++++
300	HPYSDLADVF	+++
301	FPAFLEAM	+++
302	IPIDQILNSF	+++
303	RPPPPCIAL	++++
304	SPLIGDFPAF	++
305	AASPVGSAL	+++
306	RPFPLALL	+++
307	RPHQKGWLSI	+++
308	RPDVVRTLL	++++
309	FAFYGGKSL	+++
310	SPGWAQTQL	++++
311	APRLALDPDAL	++++
312	SPSLQSSRESL	+++
313	VPLSSYVSI	++++
314	IALMKLAGPL	++
315	APVVFPAL	++++
316	NPREPEKSL	+++
317	MPYNSAHHCVV	++++
318	TPISNTGVL	++++
319	RPLDTFRVL	++++
320	APMHIDRNIL	++++
321	QPQQPGFFL	+++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
322	RAVPVGSGL	+++
323	TPHGITDIL	++++
324	LPAPLRISL	++++
325	SPRSNPVRL	++++
327	GPRTTQSSVL	++++
328	LPLHRGDLVI	+++
329	QPANFIVLL	+++
330	RPFSAIAEL	++++
331	SPDSAILKL	+++
332	SPYAGSTAF	++++
333	SVLPRALSL	+++
334	YPLSLALHF	++++
335	VPPQNPRPSL	+++
336	YPLQGPGLLSV	+++
337	IPTSRVITL	++++
338	MPATPSLKV	+++
339	GPQRTTSV	+++
340	APEPRAALL	+++
341	LPRSPPLKVL	++++
342	RPRPPKVL	+++
343	RPRPPKVLGL	+++
344	VPYPSPTCV	++++
345	SAAPPGASL	+++
346	IPMPRITWL	++++
347	SPLEKINSF	++++
348	HPAPPVTSAL	+++
349	QPRDGWPMML	++++
350	RPKSTLMNF	++++
351	SPYADIIPSA	+++
352	LPAFSKIGGIL	++++
353	KPRATWTL	+++
354	APAKDARASL	++++
355	APKTSFIAA	++++
356	RPFLRLPSL	+++
357	LPPHIFAI	++
358	APSMRLRKNQL	+++
359	SPRRLVELAGQSL	++++
360	SPASRSISLL	++++
361	SPYGSDRLVQL	++++
362	KPMLPPAAF	+++
363	KPRTPFETTA	++++
364	KPRTPFETTAQL	++++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
365	RPKHFLQML	++++
366	SPTLRQLDL	++++
367	APQVHIFSL	++++
368	NPASRLTAL	++++
369	RPYGCVLRAA	++++
370	AAHEFGHVL	++
371	APRSPGQVTPRG L	+++
372	SPSSASLTL	++++
373	LPKPDLPQLI	+
374	KPRNMTGLDL	++++
375	LPRGVLEGL	++++
376	FPQVGRTAL	++++
377	SPFSKRIKL	+++
378	SPRQPRLDF	++++
379	GPRQVLFPL	++++
380	SPYPGSAAF	++++
381	APRPRLLLL	+++
382	RPGPQRTTSV	++++
383	KPRATWTLKL	+++
448	TVYGEPRKL	++
449	RPKTSVNLISSL	++++
450	SAAARALLP	+
451	VPILPLNHAL	++++
452	QPVKKNTL	++++
453	APALPGQVTI	++++
454	SPDPAHLESL	++++
455	FPVQATIDF	++++
456	VPVSHPVLT	+++
457	RPPLSQRHTF	++++
458	VPIPTHYFVVL	++++
459	SPAPWRPWI	++++
460	APLMPLGKTL	++++
461	MPHLGPGILL	++++
462	MPLLADVRL	++++
463	LPTDLFNSVM	++++
464	VPFVPRTSV	+++
465	VPKSLPYVL	++++
466	SPMEAILVSRL	++++
467	VPRNQDWLGVSRL QL	++++
468	LPSLHVLVL	++++

SEQ ID	Secuencia	Intercambio de péptido
469	LPLDTRTSI	++++
470	RPNGEVKSEL	++++
471	LPLLAGTLLL	++
472	LPMPAITWY	++
473	LPGEREAAL	++++
474	VPKADLLTL	++++
475	IPLEIQKL	+
476	EPNPVEEIF	++
477	NPVPVITWYKDNR L	++++
478	APKFISPASQL	++++
479	APHAGGALL	++++
480	VPAAPTKAL	+++
481	SPARALLLALA	+++
482	QPSLKKIIL	++++
483	KPAAAGVKKVA	+++
484	LPASAEPKGTM	++
486	TPTRPLPSA	++
487	IPWFIKTAF	++++
488	LPLGGLPLLI	+++
489	WPNHIMLVL	++++
490	APRGPAQGEAA	++++
491	MPEADLKRIF	++
492	IPFSVDEI	+
493	LPLQQYKLV	+
494	LPLRAVNLNL	+++
495	SPSYTQASL	++++
496	MPAVSGPGPLF	+++
497	YVVKPLHPF	+++
498	RPQPQPRPAL	++++
499	QPVLPSPAC	++++

Lista de referencias bibliográficas

- 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
 Banchereau, J. et al., Cell. **106** (2001): 271-274
 Beatty, G. et al., J Immunol. **166** (2001): 2276-2282
 Beggs, J. D., Nature. **275** (1978): 104-109
 Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological),. **Vol.57** (1995): 289-300
 Boulter, J. M. et al., Protein Eng. **16** (2003): 707-711
 Braumuller, H. et al., Nature.(2013)
 Bray, F. et al., Int J Cancer. **132** (2013): 1133-1145
 Brossart, P. et al., Blood. **90** (1997): 1594-1599
 Bruckdorfer, T. et al., Curr Pharm Biotechnol. **5** (2004): 29-43
 Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 345-357
 Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. **16** (2003a): 324-332
 Cohen, C. J. et al., J Immunol. **170** (2003b): 4349-4361
 Cohen, S. N. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **69** (1972): 2110-2114
 Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science.(1995)
 Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
 Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 4163-4170
 Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003): 2197-2207
 Falk, K. et al., Nature. **351** (1991): 290-296
 Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No 11 [Internet] (2013), <http://globocan.iarc.fr>
 Follenzi, A. et al., Nat Genet. **25** (2000): 217-222
 Fong, L. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **98** (2001): 8809-8814
 Forsey, R. W. et al., Biotechnol Lett. **31** (2009): 819-823
 Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. **2** (1996): 1096-1103
 Gattinoni, L. et al., Nat Rev Immunol. **6** (2006): 383-393
 Gnjjatic, S. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **100** (2003): 8862-8867
 Godkin, A. et al., Int Immunol. **9** (1997): 905-911
 Gragert, L. et al., Hum Immunol. **74** (2013): 1313-1320
 Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual. **4th** (2012)
 Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual. **2nd** (2014)
 Gunawardana, C. et al., Br J Haematol. **142** (2008): 606-609
 Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353
 Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
 Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **84** (1987): 4611-4615
 Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients. **rd** (2000)
 Krieg, A. M., Nat Rev Drug Discov. **5** (2006): 471-484
 Kuball, J. et al., Blood. **109** (2007): 2331-2338
 Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987

- Ljunggren, H. G. et al., J Exp Med. **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., Ann N Y Acad Sci. **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat Genet. **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification. **3rd** (2004)
- Meziere, C. et al., J Immunol. **159** (1997): 3230-3237
- Molina, J. R. et al., Mayo Clin Proc. **83** (2008): 584-594
- Morgan, R. A. et al., Science. **314** (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., J Proteome Res. **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **96** (1999): 8633-8638
- Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., Eur J Immunol. **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., Virology. **202** (1994): 949-955
- Rammensee, H. et al., Immunogenetics. **50** (1999): 213-219
- Rini, B. I. et al., Cancer. **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., Science. **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132
- Saiki, R. K. et al., Science. **239** (1988): 487-491
- Schmitt, T. M. et al., Hum Gene Ther. **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. **119** (2006): 135-145
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics. **49** (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics.(1986)
- Silva, L. P. et al., Anal Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., BMC Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **23** (2014): 1985-1996
- Tran, T. T. et al., Photochem Photobiol. **90** (2014): 1136-1143
- Walter, S. et al., J Immunol. **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423
- World Cancer Report (2014)
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zufferey, R. et al., J Virol. **73** (1999): 2886-2892