

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 900 106**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2015 E 19199098 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.10.2021 EP 3616706**

(54) Título: **Nuevos péptidos y nueva combinación de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el carcinoma hepatocelular (CHC) y otros tipos de cáncer**

(30) Prioridad:

23.12.2014 GB 201423016
23.12.2014 US 201462096165 P
21.01.2015 GB 201501017

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.03.2022

(73) Titular/es:

IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE

(72) Inventor/es:

WEINSCHENK, TONI;
MAHR, ANDREA;
FRITSCHE, JENS;
MÜLLER, PHILLIP;
WIEBE, ANITA y
MISSEL, SARAH

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 900 106 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos péptidos y nueva combinación de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el carcinoma hepatocelular (CHC) y otros tipos de cáncer

5 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 epítotos peptídicos para linfocitos T asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que, por ejemplo, pueden servir
 10 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. En particular, la presente invención se refiere a varias secuencias peptídicas
 15 novedosas y sus variantes derivadas de moléculas HLA de clase I y clase II de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales o como dianas para el desarrollo de compuestos y células farmacéutica o inmunológicamente activos.

20 **Antecedentes de la invención**

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

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

35 35 El pronóstico general de los pacientes con CHC es poco halagüeño. La supervivencia relativa a 5 años ronda el 15%, según el estadio en que se encuentre en el momento del diagnóstico. En el CHC localizado, cuando el cáncer permanece aún confinado en el hígado, la supervivencia relativa a 5 años ronda el 28%. En lo que concierne al CHC regional y a distancia, cuando el cáncer se ha extendido a los órganos cercanos o distantes, es del 7% y del 2%.

40 45 Últimamente se ha efectuado un pequeño número de ensayos clínicos de inmunoterapia contra el CHC. Se han empleado citocinas para activar subgrupos de células inmunitarias y/o incrementar la respuesta inmunitaria antitumoral (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Otros ensayos se han centrado en la infusión de linfocitos infiltrantes de tumores o de linfocitos de sangre periférica activados (Shi et al., 2004a; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

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

55 55 Los péptidos fosforilados se dan a conocer, entre otras patentes, en WO 2014/39675.

Resumen de la invención

60 La presente invención concierne así a un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos conforme a

la SEQ ID N.º 47 tal y como se define en la primera de las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones adjuntas se definen otros aspectos de la invención.

5 En un primer aspecto se da conocer un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo integrado por la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 300 o una secuencia variante de las mismas que es homóloga al menos en un 80%, preferiblemente al menos en un 90% (preferiblemente idéntica al menos en un 80% o al menos en un 90%) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300, en que dicha variante se une a MHC y/o estimula linfocitos T que presentan reactividad cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido el polipéptido entero del que derivaría.

10 Se da a conocer, además, un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 300 o una variante de las mismas, que es homóloga al menos en un 80%, preferiblemente en el 88% (preferiblemente idéntica al menos en un 80% o al menos en un 88%) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300, 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.

15 20 Las tablas siguientes muestran el péptido conforme con la presente revelación, sus respectivas SEQ ID N.º, y el probable gen originario (subyacente) de tal péptido. El péptido de la Tabla 1 es reconocido por alelos HLA-A*02. Los péptidos de la Tabla 2 son, además, útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de diversas neoplasias malignas que implican la sobreexpresión o sobrerepresentación del respectivo polipéptido subyacente.

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

SEQ ID N.º	Secuencia	Identificación del gen	Símbolo oficial del gen
47	FLDTPIAKV	85407	NKD1

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

30 35 Se prefieren especialmente los péptidos –solos o en combinación– conformes con la presente revelación seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300. Más preferibles aún son los péptidos –solos o en combinación– seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 124 (véase la Tabla 1), preferiblemente reconocidos por A*02, y del grupo consistente en las SEQ ID N.º 187 a SEQ ID N.º 218 preferiblemente reconocidos por A*24, y sus usos en la inmunoterapia contra el CHC, el cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia, y preferiblemente el CHC.

40 45 50 No obstante, tal y como muestran a continuación las tablas 2 y 3, muchos de los péptidos acordes con la presente invención también pueden ser utilizados en la inmunoterapia para otras indicaciones. Las tablas presentan una relación de los péptidos seleccionados que se han hallado en otros tipos de tumor o bien sobrerepresentados (incluida la presentación específica) en más del 5% de las muestras tumorales analizadas, o bien presentados en más del 5% de las muestras tumorales analizadas con un cociente de las medias geométricas con respecto a los tejidos normales superior a 3. La sobrerepresentación se define como una presentación más elevada en la muestra tumoral que en la muestra normal con mayor presentación. Los tejidos normales en los que se contrastó la sobrerepresentación fueron: tejido adiposo, glándula suprarrenal, células sanguíneas, vaso sanguíneo, médula ósea, cerebro, cartílago, esófago, ojo, vesícula biliar, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, nervio, páncreas, glándula paratiroides, peritoneo, hipofisis, pleura, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, glándula tiroidea, tráquea, uréter y vejiga urinaria.

Tabla 2: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer – S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
47	FLDTPIAKV	Cerebro, colon, recto

Tabla 3: Péptidos acordes con la presente invención y usos específicos de los mismos en otras enfermedades proliferativas, especialmente en otros tipos de cáncer – S* = fosfoserina

SEQ ID N.º	Secuencia	Entidades adicionales
47	FLDTPIAKV	CPNM, CG, cáncer de esófago

De forma similar, los péptidos indicados en la Tabla 3 anterior pueden ser la base para el tratamiento de las enfermedades indicadas, en una forma preferida de realización combinada.

- 5 Así pues, otro aspecto de la presente revelación se refiere al uso de los péptidos acordes a la presente revelación para el tratamiento –preferentemente combinado– de una enfermedad proliferativa seleccionada del grupo siguiente: CHC, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto, y leucemia.
- 10 La presente revelación se refiere, además, a péptidos conformes con la presente revelación 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.
- 15 La presente revelación se refiere, además, a los péptidos dados a conocer previamente en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos acorde con las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.
- 20 La presente revelación se refiere, además, a los péptidos dados a conocer aquí, en que el péptido es modificado y/o incluye enlaces no peptídicos.
- 25 La presente revelación se refiere, además, a los péptidos dados a conocer aquí, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, en particular fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (Ii), o fusionado con (o integrado en la secuencia de) un anticuerpo, como por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.
- 30 La presente revelación se refiere, además, a un ácido nucleico que codifica los péptidos como los revelados aquí. La presente revelación se refiere, además, al ácido nucleico dado a conocer aquí, que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.
- 35 La presente revelación se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar y/o que expresa un ácido nucleico como el dado a conocer aquí.
- 40 La presente revelación se refiere, además, a un péptido como el dado a conocer aquí, a un ácido nucleico como el dado a conocer aquí o a un vector de expresión como el dado a conocer aquí, destinados al uso como tratamiento de enfermedades y en medicina, en particular en el tratamiento de enfermedades tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias e inmunopatológicas.
- 45 La presente revelación se refiere, además, a anticuerpos dirigidos contra los péptidos dados a conocer aquí o contra complejos formados por dichos péptidos dados a conocer aquí con moléculas del MHC, y métodos para fabricarlos.
- 50 La presente revelación concierne, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en concreto a TCR solubles (TCRs) y TCR clonados y genomodificados en linfocitos T autólogos o alogénicos, y a métodos para fabricarlos, así como a 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.
- 55 Los anticuerpos y los TCR constituyen formas de realización adicionales del uso inmunoterapéutico de los péptidos acordes con la invención en cuestión.
- 50 La presente revelación se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico como el dado a conocer aquí o a un vector de expresión como el antes descrito. La presente revelación se refiere, además, a la célula hospedadora dada a conocer aquí, que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente una célula dendrítica.
- 55 La presente revelación se refiere, además, a un método para producir un péptido como el dado a conocer aquí, comprendiendo dicho método el cultivo de la célula hospedadora dada a conocer aquí, y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

- La presente revelación se refiere, además, al citado método dado a conocer aquí, 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.
- 5 La presente revelación se refiere, además, al método dado a conocer aquí, en que dicha célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar o que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300, preferiblemente la SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 124, y la SEQ ID N.º 187 a SEQ ID N.º 218, o una variante de dichas secuencias de aminoácidos.
- 10 La presente revelación se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método dado a conocer aquí, en que dicho linfocito T reconoce selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la dada a conocer aquí.
- 15 15 La presente revelación 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 dadas a conocer aquí, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los producidos del modo indicado aquí.
- 20 20 La presente revelación se refiere, además, al uso como medicamento o en la fabricación de un medicamento de cualquiera de los péptidos descritos, del ácido nucleico dado a conocer aquí, del vector de expresión dado a conocer aquí, de la célula dada a conocer aquí, del linfocito T activado, del receptor de linfocito T o del anticuerpo u otras moléculas que se unen a péptidos y/o a complejos de péptido-MHC dados a conocer aquí. Preferiblemente, el medicamento es activo contra el cáncer.
- 25 Preferiblemente, dicho medicamento está destinado a servir como terapia celular, como vacuna o como proteína basada en un TCR soluble o en un anticuerpo.
- 30 30 La presente revelación se refiere, además, al uso dado a conocer aquí, en que las células cancerosas son células de CHC, de cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia, pero preferiblemente células de CHC.
- 35 35 La presente revelación se refiere, además, a proteínas marcadoras y biomarcadores concretos basados en los péptidos dados a conocer aquí, aquí denominados "dianas" que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del carcinoma hepatocelular (CHC). La presente revelación también se refiere al uso de estas nuevas dianas en el contexto del tratamiento del cáncer.
- 40 Existen dos tipos de moléculas MHC: las MHC de clase I y las MHC de clase II. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores MHC de clase II). Su conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos procedentes de la proteólisis mayoritariamente de proteínas endógenas, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) y péptidos grandes. Las moléculas MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan principalmente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC mediante endocitosis y después procesadas por las mismas. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.
- 45 50 55 Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de los epítopos reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos derivados de los antígenos asociados a tumor (TAA) reviste gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic et al., 2003). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los linfocitos T citotóxicos (CTL)

(Mortara et al., 2006) que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos o granulocitos (Hwang et al., 2007).

- 5 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 et al., 2006).
- 10 Los péptidos alargados de la revelación pueden actuar como epítopos activos para las MHC de clase II. Los linfocitos T cooperadores, activados por epítopos de MHC de clase II, desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8+, que 15 incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítopos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.
- 20 25 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 angiogénesis mediante la secreción de interferón gamma (IFN- γ).
- 30 35 Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan directamente como células efectoras antitumorales (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014). Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células inmunitarias, la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Pero Dengjel et al. descubrieron varios epítopos de MHC de clase II directamente en tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).
- 40 45 Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, esto es, los epítopos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están regulados al alza en las células del tumor correspondiente. Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los linfocitos T CD8+ (ligando: moléculas de MHC de clase I + epítopo peptídico) o por los linfocitos T cooperadores CD4+ (ligando: moléculas de MHC de clase II + epítopo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales.
- 50 55 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 («anclajes») en su secuencia que interaccionan 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.
- 55 La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores comprende los siguientes grupos principales:
- a) Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase, que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT)

porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatocitos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y, por tanto, se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. a) Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.

5 b) Antígenos de diferenciación: Estos TAA están presentes tanto en los tumores como en el tejido normal del que deriva el tumor; la mayoría se encuentran en melanomas y en melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son, entre otros, la tirosinasa y Melan-A/MART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.

10 c) TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente diferenciados y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítopos procesados y posiblemente presentados por los tejidos normales lo sean por debajo del límite necesario para ser reconocidos por los linfocitos T, pero que la sobreexpresión por parte de las células tumorales rompa la tolerancia vigente hasta ese momento y desencadene la respuesta antitumoral. c) Ejemplos destacados de esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

15 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 con 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. d) La especificidad (o asociación) tumoral de un péptido también puede surgir si el péptido procede de un exón del (asociado con el) tumor en el caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas con el mismo).

20 e) TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítopos nuevos en tumores, tal y como sucede con MUC1, o de fenómenos como el ayuste de proteínas durante la degradación, que en algunos casos pueden ser específicos de tumor.

25 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.

30 40 Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. En una forma de realización preferida, el péptido debe ser presentado en exceso por las células tumorales con respecto a los tejidos sanos normales. Y no solo 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 servir como dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítopos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

45 50 55

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

ese epítopo en particular.

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluidas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están

5 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.

10 No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítopo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, en un ejemplo muy preferido es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos

15 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”).

20 En el caso de los TCR y de los anticuerpos conformes a la invención la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En el caso de los TCR y anticuerpos dados a conocer aquí el factor determinante es la presentación.

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

30 En el cáncer de pulmón amicrocítico la proteína NKD1 está disminuida, pero el ARNm de la NKD1 aparece elevado, y lo primero está correlacionado con un aumento del potencial invasivo y un pronóstico desfavorable (Zhang et al., 2011). El ARNm de la NKD1 también se ha hallado elevado en células de tumores de colon humanos (Yan et al., 2001; Zhang et al., 2011).

35 Un péptido consistente o 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 otro ejemplo, 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.

45 La presente revelación se refiere, además, a un péptido dado a conocer aquí, en que el péptido es modificado y/o incluye enlaces no peptídicos como se describe más adelante aquí.

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

55 La presente revelación se refiere, además, a un ácido nucleico que codifica un péptido como el revelado aquí. La presente revelación se refiere, además, al ácido nucleico dado a conocer aquí, que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

La presente revelación se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar, que expresa y/o presenta un ácido nucleico como el dado a conocer aquí.

La presente revelación se refiere, además, a un péptido como el dado a conocer aquí, un ácido nucleico como el dado a conocer aquí o un vector de expresión como el dado a conocer aquí para el uso en medicina.

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

10 La presente revelación se refiere, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en particular a TCR solubles (TCRs) que reconocen específicamente los péptidos dados a conocer aquí y/o los complejos péptido-MHC de la misma, y métodos para sintetizarlos.

15 La presente revelación se refiere, además, a anticuerpos o a otras moléculas de unión que reconocen específicamente los péptidos dados a conocer aquí y/o los complejos de péptido-MHC de la misma, y métodos para sintetizarlos.

20 La presente revelación se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico como el dado a conocer aquí o a un vector de expresión como el dado a conocer antes. La presente revelación se refiere, además, a la célula hospedadora dada a conocer aquí, que es una célula presentadora de antígeno. La presente revelación se refiere, además, a la célula hospedadora dada a conocer aquí, en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

25 La presente revelación se refiere, además, a un método para producir un péptido como el dado a conocer aquí, comprendiendo dicho método el cultivo de la célula hospedadora dada a conocer aquí, y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

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

35 La presente revelación se refiere, además, al método dado a conocer aquí, 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 300, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

40 La presente revelación se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método dado a conocer aquí, que reconocen selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la dada a conocer aquí.

45 La presente revelación 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 dadas a conocer aquí, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los producidos del modo indicado aquí.

50 La presente revelación se refiere, además, al uso como medicamento o en la fabricación de un medicamento de cualquiera de los péptidos descritos, de un ácido nucleico dado a conocer aquí, de un vector de expresión dado a conocer aquí, de una célula dada a conocer aquí, o de un linfocito T activado dado a conocer aquí.

55 La presente revelación concierne, además, al uso dado a conocer aquí, en que dicho medicamento es una vacuna, una célula, una población de células, como, por ejemplo, una estirpe celular, TCR solubles y anticuerpos monoclonales.

La presente revelación se refiere, además, a un uso como el dado a conocer aquí, en que el medicamento

es activo contra el cáncer.

La presente revelación se refiere, además a un uso como el dado a conocer aquí, en que dichas células cancerosas son células de CHC.

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

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

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

15 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 20 para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

25 Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas del 30 MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

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

40 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 revelación 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*.

45 El término «péptido» incluye también «oligopéptido». El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantenga el epítopo o epitopos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener una 50 longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 15, aproximadamente.

El término «los péptidos de la presente invención» incluirá también los péptidos de los que consiste o comprende un péptido tal y como se ha definido antes según las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.

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

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

Un «epítopo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que pueda ser reconocido por un linfocito T provisto de 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 F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y los serotipos más frecuentes del HLA-DR. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población Norteamericana adaptadas de Mori y cols. empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$ (Mori M, et al. HLA gene and haplotype frequencies in the Norteamericán population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):1017-27). Combinations of A*02 or A*24 with certain HLA-DR alleles might be enriched or less frequent than expected from their single frequencies due to linkage disequilibrium. For details refer to Chanock et al. (S.J. Chanock, et al (2004) HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and DRB1 in an African American population from Bethesda, USA Human Immunology, 65: 1223-1235).

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia alélica
A*02	Caucásica (Norteamérica)	49,1%
A*02	Afroamericana (Norteamérica)	34,1%
A*02	Asioamericana (Norteamérica)	43,2%
A*02	Latinoamericana (Norteamérica)	48,3%
DR1	Caucásica (Norteamérica)	19,4%
DR2	Caucásica (Norteamérica)	28,2%
DR3	Caucásica (Norteamérica)	20,6%
DR4	Caucásica (Norteamérica)	30,7%
DR5	Caucásica (Norteamérica)	23,3%
DR6	Caucásica (Norteamérica)	26,7%
DR7	Caucásica (Norteamérica)	24,8%
DR8	Caucásica (Norteamérica)	5,7%
DR9	Caucásica (Norteamérica)	2,1%
DR1	Afroamericana (Norteamérica)	13,20%
DR2	Afroamericana (Norteamérica)	29,80%
DR3	Afroamericana (Norteamérica)	24,80%
DR4	Afroamericana (Norteamérica)	11,10%
DR5	Afroamericana (Norteamérica)	31,10%
DR6	Afroamericana (Norteamérica)	33,70%
DR7	Afroamericana (Norteamérica)	19,20%
DR8	Afroamericana (Norteamérica)	12,10%
DR9	Afroamericana (Norteamérica)	5,80%
DR1	Asioamericana (Norteamérica)	6,80%
DR2	Asioamericana (Norteamérica)	33,80%
DR3	Asioamericana (Norteamérica)	9,20%
DR4	Asioamericana (Norteamérica)	28,60%
DR5	Asioamericana (Norteamérica)	30,00%
DR6	Asioamericana (Norteamérica)	25,10%
DR7	Asioamericana (Norteamérica)	13,40%

(continuación)

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia alélica
DR8	Asioamericana (Norteamérica)	12,70%
DR9	Asioamericana (Norteamérica)	18,60%
DR1	Latinoamericana (Norteamérica)	15,30%
DR2	Latinoamericana (Norteamérica)	21,20%
DR3	Latinoamericana (Norteamérica)	15,20%
DR4	Latinoamericana (Norteamérica)	36,80%
DR5	Latinoamericana (Norteamérica)	20,00%
DR6	Latinoamericana (Norteamérica)	31,10%
DR7	Latinoamericana (Norteamérica)	20,20%
DR8	Latinoamericana (Norteamérica)	18,60%
DR9	Latinoamericana (Norteamérica)	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia Occidental	22%
A*24	EE.UU.	22%
A*24	Samaras de Rusia	20%
A*24	Sudamérica	20%
A*24	Europa	18%

Los péptidos de la revelación, preferiblemente cuando figuren incluidos en una vacuna de la revelación tal y como se describe aquí serán reconocidos por A*02 o A*24. Una vacuna también podría incluir péptidos

5 que se unan a cualquier MHC de clase II. Por consiguiente, la vacuna de la revelación puede ser usada para tratar el cáncer en pacientes que sean A*02 positivos, A*24 positivos o bien positivos para A*02 y para A*24, mientras que la no selección para los alotipos de MHC de clase II es necesaria debido a la naturaleza panunionista de esos péptidos.

10 Combinar, por ejemplo, péptidos A*02 y A*24 en una vacuna tiene la ventaja de que se puede tratar a un porcentaje mayor de cualquier población de pacientes que si ésta solo se dirigiera contra un único alelo MHC de la clase I. Mientras que en la mayoría de poblaciones solo se podría tratar a menos del 50% si se optara por uno solo de los alelos, la vacuna de la revelación permite tratar como mínimo al 60% de los pacientes de cualquier población relevante. En concreto, los porcentajes de pacientes positivos para al 15 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).

20 En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ADN incluye tanto ADN monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia. El término «región codificante» hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión natural del gen.

25 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.

30 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 esta revelación se ensamblan con fragmentos de ADNc y oligonucleótidos cortos de enlace, o con una serie de oligonucleótidos, que dan como resultado un gen sintético capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores procedentes de un operón microbiano o vírico.
- 5 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 ejemplo, por una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de TCR.
- 10 El término «producto de expresión» define el polipéptido o 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.
- 15 15 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.
- 20 20 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.
- 25 30 30 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.
- 35 35 El término «promotor» define una región de ADN implicada en la unión de la polimerasa de ARN para iniciar la transcripción.
- 40 45 45 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.
- 50 55 55 Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunogénicos, descritos de acuerdo con la presente revelación 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 solo 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 dados a conocer en la presente revelación, 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% en peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la

5 presente revelación 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,

10 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*.

15 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos 20 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.

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

30
$$\text{Identidad porcentual} = 100 [1 - (C/R)]$$

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

35 (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 40 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.

45 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.

50 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, cuando un aminoácido es reemplazado por otro 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, el reemplazo de una leucina por una 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».

- 5 Las sustituciones conservadoras se definen como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).
- 10 10 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 15 «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.
- 20 20 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 antigenicos de la descripción y, aun así, quedar englobados en la presente revelación. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los presentes en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados 25 como sustitutos para producir polipéptidos inmunógenos e inmunogénicos de acuerdo con la presente descripción.

- 30 30 Si se descubre que las sustituciones en más de una posición resultan en un péptido con actividad antigenica sustancialmente equivalente o mayor, como se define más abajo, entonces las combinaciones de dichas sustituciones se probarán para determinar si las sustituciones combinadas provocan efectos aditivos o sinérgicos en la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirán hasta 4 posiciones simultáneamente dentro del péptido.

- 35 35 Los péptidos de la revelación 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 5 se exponen combinaciones de las elongaciones conformes a la revelación:

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

- 40 40 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.

- 45 45 El término «respuesta de linfocitos T» define la proliferación y la activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. En el caso de los linfocitos T citotóxicos (CTL) restringidos a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden consistir en la lisis de células diana presentadoras naturales de péptido o bien sensibilizadas de manera repetida con un péptido o con un precursor del mismo; la secreción de citocinas, preferiblemente de interferón gamma, TNF-alfa o IL-2 inducida por péptido; la secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptido; o la desgranulación.

- Preferiblemente, cuando los linfocitos T específicos para un péptido dado a conocer aquí 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, 5 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.
- 10 Así pues, los epítopos de la presente revelación pueden ser idénticos a los epítopos naturales que son específicos o están asociados al tumor o bien pueden incluir epítopos que difieran como máximo en cuatro residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.
- 15 Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de células nucleadas y presentan péptidos derivados de la escisión proteolítica de principalmente proteínas endógenas, citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía.
- 20 Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y la caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos (moléculas de MHC de clase I) o por los linfocitos T CD4-positivos (moléculas de MHC de clase II) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales. Por consiguiente, uno de los fines de la presente revelación consiste en proveer composiciones de péptidos 25 que contengan péptidos de unión a complejos MHC de cualquiera de las clases.
- A la luz de los efectos secundarios graves y los gastos que supone el tratamiento contra el cáncer es evidente la urgente necesidad de mejora de los métodos pronósticos y diagnósticos. Así pues, existe la necesidad de descubrir otros factores que puedan servir como biomarcadores para el cáncer en general y 30 el carcinoma hepatocelular (CHC) en particular. Existe igualmente la necesidad de identificar factores que puedan ser utilizados para el tratamiento contra el cáncer en general y contra el CHC en particular.
- 35 La presente revelación proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente el CHC, que sobrerepresentan o presentan exclusivamente los péptidos de la revelación. Con técnicas de espectrometría de masas se ha demostrado la presentación natural por moléculas HLA de estos péptidos en muestras humanas de CHC primario.
- 40 Se ha demostrado que el gen/proteína originario (también denominado «proteína entera» o «proteína subyacente») del cual derivan los péptidos aparece notablemente sobreexpresado en los tejidos cancerosos con respecto a los tejidos normales –en la presente invención «tejidos normales» significa que son células hepáticas sanas o células de otros tejidos normales– lo cual demuestra el alto grado de relación con el tumor de los genes originarios (véase el ejemplo 2). Además, los péptidos en sí están fuertemente sobrerepresentados en el tejido tumoral –en la presente invención se entiende por «tejido tumoral» una muestra extraída a un paciente aquejado de CHC, pero no de tejidos normales (véase el ejemplo 1).
- 45 Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej. células de CHC que presentan los péptidos derivados.
- 50 Los péptidos de la presente revelación han demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están sobrerepresentados y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto de TCR solubles, como los dados a conocer aquí (véase el ejemplo 3). Asimismo, cuando los péptidos están acomplejados con el MHC correspondiente también pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o de TCR, en concreto de TCR solubles, como los dados a conocer aquí. Los métodos pertinentes son conocidos por los expertos y también se pueden hallar en la 55 bibliografía pertinente. Así pues, los péptidos de la presente revelación 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 revelación en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.
- Una «composición farmacéutica» preferiblemente es una composición apta para la administración a un ser humano en un contexto médico. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es estéril y se fabrica conforme a las directrices de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).
- Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo $-NH_2$ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej. ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, 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 hace empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.
- En una forma de realización especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma de sales de ácido acético (acetatos), trifluoroacetatos o ácido clorhídrico (cloruros).
- Se prefiere especialmente una composición y/o el uso de dicha composición, por ejemplo en forma de vacuna.
- Los péptidos de la presente revelación 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 más de la invención que proporciona un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: La inmunización de 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 por HLA; el aislamiento de moléculas de ARNm a partir de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; la producción de una fagoteca que contenga moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y el aislamiento de al menos un fago de dicha fagoteca, en que al menos ese fago contenga dicho anticuerpo que se une específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II unido con dicho antígeno restringido a HLA.
- Existe otro aspecto más de la invención que proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, en el que el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo químérico.
- Aún existe otro aspecto más de la presente invención que se refiere a un método para producir dicho anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: La inmunización de 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 por HLA; el aislamiento de moléculas de ARNm a partir de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; la producción de una fagoteca que contenga moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y el aislamiento de al menos un fago de dicha fagoteca, en que al menos ese fago contenga dicho anticuerpo capaz de unirse específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II unido con dicho antígeno restringido por HLA. 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. (

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

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un receptor de linfocito T soluble (TCRs) 15 que reconoce un complejo de péptido-MHC específico. Dichos receptores de linfocitos T solubles se pueden generar a partir de clones de linfocitos T específicos, cuya afinidad se puede incrementar por mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, Liddy et al., 2012). A fin de estabilizar los receptores de linfocito T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta 20 se pueden enlazar por ejemplo mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (véanse Boulter et al., 2003; Card et al., 2004 y Willcox et al., 1999). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191), dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia a un receptor. Se puede encontrar más información en WO 25 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. Se describe una combinación de TCRs en WO 2012/056407A1. Otros métodos de producción se revelan en WO 2013/057586A1.

Además, los péptidos y/o los TCR o anticuerpos u otras moléculas de unión de la presente revelación se 30 pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

Para seleccionar los péptidos sobrerepresentados se calcula un perfil de presentación que muestra la 35 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., 2007) ajustando para el análisis múltiple con la Tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*) (Benjamini and Hochberg, 1995).

Para la identificación y la cuantificación relativa de los ligandos HLA mediante espectrometría de masas 40 se purificaron moléculas HLA de muestras de tejido criogenizadas y se aislaron los péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y se identificaron sus secuencias mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con ionización por nano-electronebulización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de fragmentación de los TUMAP naturales registrados a partir de muestras de CHC (N = 16 muestras A*02-positivas que incluyeron trece 45 muestras A*02:01-positivas, N = 15 muestras A*24-positivas) con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación natural de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de 31 pacientes con CHC.

50 La plataforma para el descubrimiento de fármacos patentada XPRESIDENT® v2.1 (véase, por ejemplo, US 2013-0096016) 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 55 de la cuantificación diferencial sin marcaje con los datos adquiridos de CL-EM procesados con una plataforma de análisis de datos patentada que combina algoritmos para la identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

Se calcularon los niveles de presentación incluyendo estimaciones de error para cada péptido y cada muestra. 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.

- 5 Se purificaron los complejos HLA-péptido presentes en muestras de tejido de CHC y se aislaron los péptidos asociados a HLA para después analizarlos con CL-EM (véanse ejemplos). Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de CHC primario para confirmar su presentación en el CHC primario.
- 10 Los TUMAP identificados en múltiples tejidos tumorales de CHC y normales se cuantificaron con recuento iónico de los datos de CL-EM sin marcaje. El método supone que las áreas de señal de CL-EM del péptido en cuestión 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.
- 15 La presente revelación 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 300, o a una variante de las mismas que es al menos un 90% homóloga (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300 o una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, en que dicho péptido no es un polipéptido entero subyacente.
- 20 La presente revelación 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 300 o a una variante de las mismas que es al menos homóloga en un 90% (preferiblemente idéntica) a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300, 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.
- 25 La presente revelación se refiere, además, a péptidos dados a conocer aquí que tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) de clase I o II.
- 30 La presente revelación se refiere, además, a los péptidos dados a conocer aquí en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos acorde con las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.
- 35 La presente revelación se refiere, además, a los péptidos dados a conocer aquí, en que el péptido es modificado (químicamente) y/o incluye enlaces no peptídicos.
- 40 La presente revelación se refiere, además, a los péptidos dados a conocer aquí, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, en particular fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (II), o fusionado con (o integrado en la secuencia de) un anticuerpo, como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.
- 45 La presente revelación se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos dados a conocer aquí, siempre que el péptido no sea la proteína humana completa (entera).
- 50 La presente revelación se refiere, además, al ácido nucleico dado a conocer aquí, que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.
- 55 La presente revelación se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico como el dado a conocer aquí.
- La presente revelación se refiere, además, a un péptido como el dado a conocer aquí, un ácido nucleico como el dado a conocer aquí o un vector de expresión como el dado a conocer aquí para el uso en medicina, en particular en el tratamiento del CHC.
- La presente revelación se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico como

el dado a conocer aquí o a un vector de expresión como el dado a conocer aquí.

La presente revelación se refiere, además, a la célula hospedadora como la dada a conocer aquí, que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente una célula dendrítica.

5 La presente revelación se refiere, además, a un método como el dado a conocer aquí, en que dicho antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con una célula presentadora de antígeno.

10 La presente revelación se refiere, además, al método dado a conocer aquí, 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 300, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

15 La presente revelación se refiere, además, al uso como medicamento o en la fabricación de un medicamento de cualquiera de los péptidos descritos, de un ácido nucleico dado a conocer aquí, de un vector de expresión dado a conocer aquí, de una célula dada a conocer aquí, o de un linfocito T activado dado a conocer aquí. La presente revelación se refiere, además, a un uso como el dado a conocer aquí, en que el medicamento es activo contra el cáncer.

20 La presente revelación se refiere, además, a un uso como el dado a conocer aquí, en que dicho medicamento es una vacuna. La presente revelación se refiere, además, a un uso como el dado a conocer aquí, en que el medicamento es activo contra el cáncer.

25 La presente revelación se refiere, además, al uso dado a conocer aquí, en que las células cancerosas son células de CHC o células de otros tumores sólidos o hematológicos, como las de cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de colon o recto o leucemia.

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

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

40 Si es posible, los anticuerpos de la revelación se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la revelación también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entiende que para generar los anticuerpos de la revelación se pueden emplear tanto los polipéptidos marcadores del CHC enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la revelación se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural, o se puede producir con técnicas de ADN recombinante.

45 Por ejemplo, un ADNc que codifique un péptido como el dado a conocer aquí, como un péptido acorde con las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300, o una variante o fragmento de los mismos, se puede expresar en células procariotas (p. ej. bacterias) o eucariotas (p. ej. células de levadura, insecto o mamífero), a partir de la cual se purificará la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente al polipéptido marcador del CHC utilizado para generar el anticuerpo como el dado a conocer aquí.

55 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 ellos (p. ej. ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para más detalles sobre la generación y el análisis de anticuerpos, véase, por ejemplo, Harlow and Lane, 2013). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con pruebas ELISA, inmunotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.

- 5 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
- 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 «químéricos» 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 (US 4.816.567).
- 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, delecciones, 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 biología, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso, el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagénesis dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej. de ratón) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos químicos de las mismas (como Fv, Fab, Fab' u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una pequeña secuencia derivada de inmunoglobulinas no humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como

ratón, rata o conejo que está dotada de la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales (FR) del fragmento Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no están presentes ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en las secuencias estructurales.

5 En general, el anticuerpo humanizado comprenderá casi todas de al menos uno, y normalmente de dos dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponderán a las de la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana.«

10 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, a un anticuerpo humanizado se le introducen uno o varios residuos de aminoácidos de origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son denominados residuos «importados», que 15 normalmente se extraen del dominio variable «importado». La humanización se puede llevar a cabo básicamente sustituyendo la o las secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos químicos (Pat. EE.UU. N.º 4.816.567), en los que una parte notablemente más pequeña que un dominio variable humano intacto 20 ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

25 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 químicos 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 30 humanos tras la exposición al antígeno. También se pueden producir anticuerpos humanos en fagocitos.

35 Los anticuerpos de la invención se administran preferentemente a un sujeto incorporándolos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente a la formulación se le añade una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución esté comprendido aproximadamente entre 5 y 8, y más preferiblemente entre 7 y 40 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.

45 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.

50 Las dosis y pautas de administración más adecuadas se pueden determinar empíricamente; la toma de decisiones a este respecto forma parte de los conocimientos de la materia. Las personas versadas en la materia saben que la dosis de anticuerpos a administrar depende, por ejemplo, del sujeto que va a recibir al anticuerpo, la vía de administración, el tipo concreto de anticuerpo y de otros medicamentos que se le estén administrando. La dosis diaria típica de anticuerpo cuando se utiliza solo puede oscilar entre 1 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los susodichos factores. Tras la 55 administración del anticuerpo, preferiblemente para tratar el CHC, la eficacia del anticuerpo terapéutico se puede evaluar de varios modos bien conocidos por el médico especialista. Por ejemplo, se puede controlar el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer en el sujeto receptor del tratamiento utilizando técnicas de imagen oncológicas estándar. Todo anticuerpo administrado con fines terapéuticos que detenga el crecimiento del tumor, reduzca su extensión y/o impida la aparición de nuevos tumores en contraste con

la evolución de la enfermedad si no se produjera la administración del anticuerpo, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer.

Puesto que los péptidos mencionados en las Tablas de las páginas anteriores de la revelación y sus polipéptidos subyacentes se expresan notablemente en el CHC, y en cambio se expresan en niveles sumamente bajos en las células normales, la inhibición de una proteína seleccionada del grupo consistente en productos proteicos de los genes siguientes: Se prefiere para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR dirigidos contra GLUL, GPAM, PLIN2, SLC16A1, SLC9A3R1, PCBD1, SEC16A, AKR1C4, ABCB11, HAL, CYP2E1, C4A, C4B, ALDH1L1, CRP, ACSL4, EEF2, HLT, FBXO22, GALK1, TMCO1, TMEM33, 5 ZNF318, IPO9, AMACR, C1QTNF3, CYP4F8, CYP4F3, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, MOCOS, A1CF, COL18A1, HPR, LBP, C19orf80, CFHR5, ITIH4, TMEM110, LARP4, LMF2, SLC10A5, y SLC16A11; más preferido aún para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR dirigidos contra son ANKFY1, C12orf44, 10 C16orf58, CPSF1, DCAF8, PEX19, DDX11, DDX12P, DECR2, NME4, DENND5B, DYM, EDC4, ERI3, FAM20A, FNDC3A, GPR107, GYG2, HEATR2, IFT81, KCTD3, SHKBP1, KIAA1324L, KLHL24, MARCH6, 15 MBTPS2, MIR1279, CPSF6, NOC4L, NXF1, PANK2, PCNXL3, PIPSL, PSMD4, PSMD14, SLC35B1, TCP11L2, THNSL2, THOC2, TOMM5, TRAPPC6B, TRIM54, TRIM55, TRIM63, UGGT2, URB1, VPS54, WIZ, ZNF451, RFTN2, SCFD1, SERINC5, CCT7P2, CMAS, ANKS1A, C17orf70, CCT7, CDK5RAP2, CLPTM1, y preferido sobre todo para la inhibición y para los anticuerpos y/o los TCR dirigidos contra son 20 APOB, FASN, y/o COPA; y la expresión o la actividad de esos marcadores puede integrarse preferiblemente en una estrategia terapéutica, p. ej. para el tratamiento o la prevención del CHC.

El principio de la terapia antisentido se basa en la hipótesis de que es posible suprimir la expresión génica de secuencias específicas (ya sea por vía transcripcional o traduccional) mediante la hibridación en el interior de la célula del ADN genómico o del ARNm con una molécula antisentido complementaria a ellos.

25 La formación de ese ácido nucleico bicatenario híbrido trastoca la transcripción del ADN genómico que codifica el antígeno tumoral que constituye la diana, o altera el procesamiento/transporte/traducción y/o la estabilidad del ARNm del antígeno tumoral diana.

30 Los ácidos nucleicos antisentido se pueden hacer llegar a las células con diversas estrategias. Por ejemplo, a un sujeto se le pueden administrar directamente oligonucleótidos antisentido o ARN antisentido (p. ej., por inyección intravenosa) de tal forma que puedan ser absorbidos por las células tumorales. Otra alternativa consiste en la introducción en células in vivo de vectores virales o plasmídicos que codifiquen ARN antisentido (o fragmentos de ARN). Los efectos antisentido también se pueden inducir con secuencias codificantes, pero la magnitud de los cambios fenotípicos es muy variable. Los cambios 35 fenotípicos inducidos por la terapia antisentido se valoran en función de los cambios en, p. ej. las concentraciones del ARNm diana, concentraciones de la proteína diana y/o niveles de actividad de dicha proteína.

40 En un ejemplo concreto, la inhibición de la función del marcador/diana del CHC con terapia génica antisentido se puede lograr con la administración directa de ARN antisentido del marcador tumoral a un sujeto. El ARN antisentido del marcador tumoral se puede producir y aislar con una técnica estándar, pero se produce más fácilmente con la transcripción in vitro utilizando un ADNc antisentido del marcador tumoral controlado con un promotor eficiente (p. ej. el promotor de T7). La administración a células del ARN 45 antisentido del marcador tumoral se puede efectuar con cualquiera de los métodos de administración directa de ácidos nucleicos descritos a continuación.

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

55 En los métodos susodichos, que incluyen la administración y la absorción de ADN exógeno por las células del sujeto (transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos de la presente revelación pueden ser incorporados a un vector en forma de ADN desnudo o de ácidos nucleicos para suministrar los ácidos nucleicos a las células con los que inhibir la expresión de la proteína marcadora del CHC. El vector puede estar disponible en una preparación comercial, como un vector adenovírico (Quantum Biotechnologies Inc., Laval, Quebec, Canadá). La liberación del ácido nucleico o del vector en las células se puede materializar

- a través de varios mecanismos. Como ejemplo, puede ser a través de liposomas con preparaciones comerciales de liposomas como Lipofectin, Lipofectamine (GIBCO-25 BRL, Inc., Gaithersburg, Md., EE.UU.), Superfect (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y Transfectam (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis., EE.UU.), así como otros liposomas desarrollados según los procedimientos habituales en la técnica.
- 5 Asimismo, el ácido nucleico o el vector de esta invención se pueden suministrar *in vivo* mediante electroporación, una tecnología que ofrece Genetronics, Inc. (San Diego, California, EE.UU.) o mediante un aparato Sonoporation (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Arizona, EE.UU.).
- Como ejemplo, el vector puede ser un sistema viral, como un sistema de vector retrovírico que puede 10 encapsidar un genoma retrovírico recombinante. El retrovirus recombinante puede ser usado para infectar y así inocular el ácido nucleico antisentido a las células infectadas que inhibía la expresión de una proteína seleccionada entre el grupo consistente en las proteínas antes mencionadas. El método exacto para introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero no se limita al uso de vectores retrovíricos. Existen otras técnicas comunes para llevar a cabo este procedimiento, tales como vectores adenovíricos, 15 vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores lentivíricos, vectores retrovíricos seudotipados. También se pueden utilizar técnicas de transducción física, como liposomas y a través de receptores y otros mecanismos de endocitosis. La presente invención se puede utilizar en conjunción con cualquiera de estos y de otros métodos usuales de transferencia génica.
- 20 Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (Kd) es inferior a $1 \times 10 \mu\text{M}$.
- 25 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 convencional, confocal y electrónica; resonancia magnética y espectroscopía; radioscopía, tomografía computadorizada y tomografía por emisión de positrones. Las 30 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 35 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 reciente o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante como el formol. El corte fijado o incluido que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y 40 un anticuerpo secundario, de modo que el anticuerpo se emplea para detectar la expresión *in situ* de las proteínas.
- Tal y como se ha dicho antes, la presente revelación 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 300 o una variante de las 45 mismas que es homóloga en un 90% a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300, o una variante de las mismas que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido. Los péptidos de la revelación tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) de clase I o a las versiones alargadas de dichos péptidos a una de clase II.
- En la presente revelación el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad 50 porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX y otras 55 herramientas de análisis.
- Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido (Fong et al. 2001; Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; y Appay et al., 2006).

- Por «variante» de la secuencia de aminoácidos los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos indicadas en las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300. 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 revelación. Como se puede deducir de la bibliografía (Godkin et al. 1997) y de las bases de datos científicas (Rammensee et al. 1999), 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 300, 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 revelación conservan la capacidad para unirse a los TCR de los linfocitos T activados, que después pueden reaccionar con células y lisar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la revelación.
- Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el receptor del linfocito T pueden ser modificados sustituyéndolos por otros aminoácidos cuya incorporación no afecte sustancialmente a la reactividad de los linfocitos T y no suprima la unión al MHC pertinente. Así pues, aparte de la condición indicada, el péptido de la revelación puede ser cualquier péptido (en cuyo término los inventores incluyen oligopéptidos o polipéptidos), que incluya las secuencias de aminoácidos o una porción o una variante de las mismas tal y como se indican.
- Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el TCR pueden ser modificados sustituyéndolos por otros aminoácidos cuya incorporación no afecte sustancialmente a la reactividad de los linfocitos T y no suprima la unión al MHC pertinente. Así pues, aparte de la condición indicada, el péptido de la invención puede ser cualquier péptido (en cuyo término los inventores incluyen oligopéptidos o polipéptidos), que incluya las secuencias de aminoácidos o una porción o una variante de las mismas tal y como se indican.
- También pueden ser adecuados péptidos más largos. También es posible que los epítopenos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyan el epítopo real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítopo de interés sean residuos que no afecten sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epítopo durante el procesamiento.
- En consecuencia, la presente revelación proporciona péptidos y variantes de epítopenos de MHC de clase I en los que el péptido o variante tienen una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 14, esto es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos, que en el caso de los péptidos de unión de clase II también puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 aminoácidos.
- Por supuesto, el péptido o variante conforme a la presente revelación tendrá la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II.
- La unión de un péptido o una variante a un complejo MHC se puede analizar con métodos conocidos en la técnica.
- En un ejemplo especialmente preferido de la revelación el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300.
- «Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente revelación, además de la

secuencia conforme a cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300 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 epítopo para el epítopo de moléculas MHC.

- 5 No obstante, dichos segmentos pueden ser importantes para facilitar la introducción eficaz del péptido conforme a la presente revelación en las células. En una forma de realización de la presente revelación, el péptido forma 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 revelación se pueden fusionar con un anticuerpo tal y como se describe en la presente memoria, o con una parte funcional del mismo, en particular integrándolo en la secuencia del anticuerpo, para que vayan dirigidos específicamente por dicho anticuerpo, o por ejemplo, con un anticuerpo que es específico para las células dendríticas tal y como se describe en la presente memoria.
- 10 15 Además, el péptido o variante pueden ser modificados aún más para mejorar la estabilidad y/o la unión a las moléculas del 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.
- 20 25 30 35 40 45 50 En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos por Meziere et al. (1997). Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteolisis.
- Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH₂-NH, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. La patente de EE. UU. 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-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 NaCNBH3.
- 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, a los extremos amino de los péptidos se pueden añadir grupos hidrófobos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo. 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 revelación 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 revelación 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 descripción.
- De manera similar, un péptido o variante de la descripción pueden ser modificados químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005. 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 sulfidrilo con ácido perfórmico para convertir la cisteína en ácido cisteíco, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o

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

- 5 En resumen, la modificación de p. ej. los residuos arginilos de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilgioxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilgioxal 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.
- 10 La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro. El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico. Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los residuos de lisina y otros grupos α -amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etilen)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas. Los residuos de metionina de las proteínas se pueden modificar, por ejemplo, con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55
- La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro. El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico. Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los residuos de lisina y otros grupos α -amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etilen)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas. Los residuos de metionina de las proteínas se pueden modificar, por ejemplo, con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.
- Los residuos tirosilo se pueden modificar con tetranitrometano y N-acetilimidazol. La formación de enlaces cruzados por medio de la formación de ditirosina se puede consumar con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.
- Estudios recientes sobre la modificación del triptófano han usado N-bromosuccinimida, 2-hidroxi-5-nitrobencilbromuro o 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercaptopo)-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 en que el péptido está modificado o incluye enlaces no peptídicos es un ejemplo preferido de la revelación. En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contiene enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestran Lukas et al. (Solid-phase peptide synthesis under continuous-flow conditions. Proc Natl Acad Sci USA. May 1981; 78(5): 2791-2795) y las referencias citadas en el mismo. La protección temporal del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxicarbonílicos (en el caso de la lisina y la histidina), derivados trilitados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfónicos (en el de la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrilo para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros siguientes: dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacrilatoletilendiamina (entrelazante) y acriloilsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico o isotina. Una vez

completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (scavengers) al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que

5 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 se eliminan con un procedimiento de extracción simple 10 que con la lyophilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).

La purificación puede llevarse a cabo mediante una sola o una combinación de técnicas como la 15 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 20 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.

25 Otro aspecto de la revelación proporciona un ácido nucleico (por ejemplo un polinucleótido) que codifica un péptido o variante peptídica de la revelación. 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, solo los péptidos que 30 contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la descripción proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido conforme a la descripción.

35 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.

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

45 Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la revelación se sirve de 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.

50 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 revelación. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la revelación puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificando 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 revelación. 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 revelación se puede unir con una amplia variedad de secuencias distintas de ADN 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.

5 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.

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

15 20 Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el ADN recombinante de la revelación se cultivarán durante el tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que las personas versadas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas reveladas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y, finalmente, ser recuperado.

25 30 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.

35 40 La presente revelación también se refiere a una célula hospedadora transformada con un constructor de vector polinucleotídico de la presente revelación. 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, Maryland, EE.UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, Maryland, 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 estípites celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células hospedadoras de 45 50 mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas por ejemplo en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols», Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas versadas en la materia.

55 50 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 que concierne a la transformación de las células hospedadoras procariotas, véanse, por ejemplo, Cohen y cols. (1972) y Sambrook y cols. (1989). La transformación de células de levadura se describe en Sherman y cols. (1986). El método de Beggs también es útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo, el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, Maryland 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o la 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.

- 5 Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la revelación son útiles para la preparación de péptidos de la revelación, 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 revelación 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.
- 10 En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene ácido prostático fosfatasa (PAP) fueron aprobadas por la 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).
- 15 20 Otro aspecto de la revelación 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.
- 25 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).
- 30 35 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.
- 40 45 Preferentemente, 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.
- 50 De forma similar, si se utiliza como antígeno un epítopo de MHC de clase I, los linfocitos T serán linfocitos T CD8-positivos.

Si una célula presentadora de antígeno es transfundida para expresar un epítopo de ese tipo, la célula

comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 300, 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 y cols. (1995) recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de linfocitos T. Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter y cols. (2003) describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En la presente revelación, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (micropelículas) 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. Por ejemplo, además de células de *Drosophila* y células T2, para presentar antígenos se pueden usar otras células tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras, células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo, se pueden utilizar virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta et al. (1994)), que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños.

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

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 300.

Preferentemente, el linfocito T reconocerá la célula interaccionando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo, uniéndose. 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 revelación 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 revelación, comprendiendo dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los definidos arriba.

Por «expresado de forma aberrante» los inventores también quieren decir que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen está reprimido en el

tejido del que deriva el tumor pero en cambio se expresa en éste. Por «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el polipéptido está presente como mínimo en una concentración 1,2 veces mayor que en el tejido normal; preferentemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferentemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que la concentración presente en el tejido normal.

- 5 Los linfocitos T se pueden obtener por métodos conocidos en la materia, como, por ejemplo, los antes descritos.
- 10 Los protocolos para la llamada transferencia adoptiva de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos en la técnica. Se pueden encontrar revisiones en: Gattinoni et al. (2006) y Morgan, et al. (2006).

15 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.

20 Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de forma i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas 25 inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como, por ejemplo, liposomas. El péptido también se puede conjugar con un portador adecuado como la hemocianina 30 de lapa californiana (KLH) o el manano (véase por ejemplo WO 95/18145). El péptido también se puede etiquetar, o puede ser una proteína de fusión, o una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a los linfocitos T CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de los linfocitos T CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, en el caso de los epítopos de MHC de clase I que estimulan a los linfocitos T CD8 la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítopos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien 35 conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

40 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 300 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciseis, diecisiete o dieciocho péptidos. El péptido o péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

45 En otro 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 300, 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. El péptido o péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

55 El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Se puede consultar una revisión general, por ejemplo, Pascolo 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

5 incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. También pueden utilizarse métodos de introducción físicos, como la «pistola génica». El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo, con un epítopo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto tal y como se ha indicado antes.

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

15 10 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, resiquimod e interferón-alfa.

20 15 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.

25 20 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 amortiguadores, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoenestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como, por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd Ed., 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2112253, por ejemplo.

30 35 La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular del carcinoma hepatocelular (CHC) y de otras neoplasias malignas.

La presente invención también contempla un equipo que comprende:

- 40 40 (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.

45 50 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.

55 55 Los equipos de la presente invención comprenden, preferiblemente, una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p. ej. viales con doble cámara), jeringas (como jeringas con doble cámara) y tubos de ensayo. El envase puede estar formado por materiales diversos como vidrio o plástico. Preferiblemente el kit y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada

a la administración subcutánea.

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

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

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

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

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

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

Puesto que los péptidos de la invención proceden del CHC, el medicamento de la invención debe ser utilizado preferentemente para tratar el CHC.

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

varias dianas, lo que es importante para la eficacia (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

En las Figuras:

- 5 La Figura 1 muestra la sobrerepresentación de varios péptidos en tejidos normales (gris oscuro) y en el CHC (gris claro). Figura 1A) APOB, Péptido: ALVDTLKVF (A*02) (SEQ ID N.º 7), tejidos de izquierda a derecha; 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 tractos gastrointestinales, 3 corazones, 16 riñones, 4 muestras de leucocitos, 45 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 1 nervio periférico, 1 glándula pituitaria, 10 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 1 membrana serosa, 3 pieles, 4 bazos, 7 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 20 hígados; Figura 1B) ALDH1L1, Péptido: KLQAGTVFV (A*02) (SEQ ID N.º 2), tejidos de izquierda a derecha; 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 4 esófagos, 2 vesículas biliares, 3 tractos gastrointestinales, 3 corazones, 16 riñones, 4 muestras de leucocitos, 45 pulmones, 15 1 ganglio linfático, 1 ovario, 7 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 1 membrana serosa, 3 pieles, 4 bazos, 7 estómagos, 1 testículos, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 20 hígados; Figura 1C) C8B, Péptido: AYLLQPSQF (A*24) (SEQ ID N.º 200), tejidos de izquierda a derecha: 2 glándulas suprarrenales, 1 arteria, 4 cerebros, 1 mama, 5 colones, 1 corazón, 13 riñones, 9 pulmones, 3 páncreas, 2 rectos, 3 pieles, 1 bazo, 12 estómagos, 1 timo, 20 2 úteros y 9 hígados; Figura 1D) RAD23B Péptido: KIDEKNFVV (SEQ ID N.º 63) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 25 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1E) RAD23B, Péptido: KIDEKNFVV (SEQ ID N.º 63), solo se exponen las muestras en que se detectó el péptido. 5 estirpes celulares, 1 tejido normal (1 glándula suprarrenal), 16 tejidos cancerosos (2 cánceres cerebrales, 4 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de recto, 1 cáncer de vejiga urinaria y 3 cánceres de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1F) RFNG RLPPDTLLQQV (SEQ ID N.º 92), solo se exponen las muestras en que se detectó el péptido. 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tractos gastrointestinales, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 30 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1G) RFNG, Péptido: RLPPDTLLQQV (SEQ ID N.º 92), solo se exponen las muestras en que se detectó el péptido. 2 estirpes celulares, 2 tejidos normales (2 glándulas suprarrenales), 17 tejidos cancerosos (1 cáncer cerebral, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de esófago, 5 cánceres hepáticos, 4 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de próstata, 2 cánceres de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1H) FLVCR1, Péptido: SVWFGPKEV (SEQ ID N.º 104) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tractos gastrointestinales, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 35 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1I) FLVCR1, Péptido: SVWFGPKEV (SEQ ID N.º 104), solo se exponen las muestras en que se detectó el péptido. 9 estirpes celulares, 1 tejido normal (1 intestino delgado), 16 tejidos cancerosos (1 cáncer cerebral, 1 cáncer de mama, 5 cánceres hepáticos, 5 cánceres de pulmón, 1 cáncer de piel, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria y 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha); Figura 1J) IKBKAP, Péptido: LLFPHPVNQV (SEQ ID N.º 156) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tubos digestivos, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 40 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1K) IKBKAP, Péptido: LLFPHPVNQV (SEQ ID N.º 156), solo se exponen las muestras en que se detectó el péptido: 7 estirpes celulares, 2 cultivos primarios, 1 tejido normal (1 colon), 55 34 tejidos cancerosos (1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 2 cánceres de esófago, 2 leucemias leucocíticas, 4 cánceres hepáticos, 11 cánceres de pulmón, 3 cánceres de ganglios linfáticos, 5 cánceres de ovario, 4 cánceres de vejiga urinaria) (de izquierda a derecha); Figura 1L) NKD1, Péptido: FLDTPIAKV (SEQ ID N.º 47) 1 membrana serosa, 1 tejido adiposo, 3 glándulas suprarrenales, 2 arterias, 2 médulas óseas, 7 cerebros, 3 mamas, 13 colones, 2 vesículas biliares, 3 tractos

- gastrointestinales, 3 corazones, 12 riñones, 4 muestras de leucocitos, 19 hígados, 43 pulmones, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 6 páncreas, 1 nervio periférico, 1 hipófisis, 3 pleuras, 1 próstata, 6 rectos, 3 músculos esqueléticos, 3 pieles, 4 bazos, 5 estómagos, 1 testículo, 2 timos, 3 glándulas tiroides, 2 úteros, 2 venas y 4 esófagos; Figura 1M) NKD1, Péptido: FLDTPIAKV (SEQ ID N.º 47), solo se exponen las muestras en que se detectó el péptido: 1 enfermedad de otro tipo (encefalocele), 2 tejidos normales (1 pulmón, 1 bazo), 35 tejidos cancerosos (5 cánceres cerebrales, 6 cánceres de colon, 1 cáncer de esófago, 6 cánceres hepáticos, 9 cánceres de pulmón, 1 cáncer de ovario, 1 cáncer de próstata, 4 cánceres de recto y 2 cánceres de estómago) (de izquierda a derecha).
- 5 La Figura 2 muestra perfiles de expresión a modo de ejemplo (expresión relativa comparada con el riñón normal) de genes originarios de la presente invención que están fuertemente sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el CHC en un conjunto de tejidos normales (gris oscuro) y de 12 muestras de CHC (gris). Figura 2A) APOB, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2B) AMACR, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2C) ALDH1L1, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2D) FGG, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero, 1 vena; Figura 2E) C8B, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero y 1 vena; y Figura 2F) HSD17B6, tejidos de izquierda a derecha: 1 glándula suprarrenal, 1 arteria, 1 médula ósea, 1 cerebro (entero), 1 mama, 1 colon, 1 esófago, 1 corazón, 3 riñones, 1 muestra de leucocitos, 1 hígado, 1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 ovario, 1 páncreas, 1 placenta, 1 próstata, 1 glándula salival, 1 músculo esquelético, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 testículo, 1 timo, 1 glándula tiroides, 1 vejiga urinaria, 1 cuello uterino, 1 útero y 1 vena.
- 40 La Figura 3 muestra a título de ejemplo resultados de la citometría de flujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido. Para más explicaciones véase el ejemplo 4.
- 45 La Figura 4 muestra a título de ejemplo resultados de la citometría de flujo tras la tinción con multímeros específicos de péptido. Para más explicaciones véase el ejemplo 4.

EJEMPLOS

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

Muestras de tejido

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

a -70 °C o una temperatura inferior hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

5 Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron por inmunoprecipitación de los tejidos sólidos siguiendo un protocolo ligeramente modificado (Falk, K., 1991; Seeger, F.H. T et al., 1999) con el anticuerpo específico de HLA-A*02 BB7.2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarosa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

10 Análisis por espectrometría de masas

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema nanoAcquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos 15 se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d.i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida 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% 20 al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente nano-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). Los 25 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 tandem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia.

30 La cuantificación relativa de la CL-EM sin marcaje se efectuó por recuento iónico, es decir por extracción y análisis de las características CL-EM (Mueller et al., 2007a). El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron además con deconvolución del estado de carga y alineamiento del tiempo de retención (Mueller et al. 2007b; Sturm et al. 2008). Por último, todas las características CL-EM se cotejaron 35 con los resultados de la identificación de secuencias para combinar los datos cuantitativos de muestras y tejidos diferentes con los perfiles de presentación de péptidos. Los datos cuantitativos se normalizaron en proporción dos tercios de acuerdo con la tendencia central para tener en cuenta la variación entre los duplicados técnicos y biológicos. De ese modo, cada péptido identificado se puede asociar con datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo, todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la 40 coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Se calculó un perfil de presentación de cada péptido que mostraba la presentación media de la muestra, así como las variaciones de los duplicados. El perfil superpone muestras de CHC con muestras de tejido normal de referencia.

45 En la Figura 1 se muestran perfiles de presentación de péptidos sobrerepresentados a modo de ejemplo. En la Tabla 6 se muestran las puntuaciones de presentación de péptidos de ejemplo.

Tabla 6: Puntuaciones de presentación. La tabla enumera los péptidos que en los tumores aparecen sobrerepresentados en diverso grado con respecto a un grupo de tejidos normales: en grado sumo (+++), acusado (++) y notable (+). S* = fosfoserina

SEQ ID N. ^º	Secuencia	Presentación del péptido
47	FLDTPIAKV	+

50

EJEMPLO 2

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

55 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.

5

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 10 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.
- 15 El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por vía comercial (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Amsterdam, Países Bajos; BioChain, Hayward, California, EE.UU.) El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción.
- 20 La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Experimentos con micromatrices

- 25 El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ARNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del 30 manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 35 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes programados en todos los parámetros. Para la normalización se usaron 100 genes constitutivos (*housekeeping*) suministrados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de señal dados 40 por el software y la muestra normal de riñón se ajustó de forma arbitraria en 1,0. En la Fig. 2 se exponen ejemplos de perfiles de expresión de genes originarios de la presente revelación que aparecen muy sobreexpresados o que se expresan exclusivamente en el CHC. Los grados de expresión de otros genes mostrados a título de ejemplo se exponen en la Tabla 7.

45 Tabla 7: Grados de expresión. La tabla enumera péptidos derivados de genes no relacionados con la invención que en los tumores aparecen sobrerepresentados en diversos grados con respecto a un grupo de tejidos normales: muchísimo (+++), mucho (++) y más (+).

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

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión del gen
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
31	YQMDIQQEL	+++
38	ALADVVHEA	+
39	ALDPKANFST	+
41	ALLELDEPLVL	+++
42	ALLGGNVRMML	+
44	ALQDAIRQL	+
45	ALQDQLVLV	++
46	AMAEMKVVL	++
48	FLLEQPEIQV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
50	FTIPKLYQL	+++
52	GLFNAELLEA	+++
53	GLIHLEGDTV	+++
55	GLYGRTEIL	+++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	+
66	KLHEEIDRV	+++
67	KLKETIQKL	+++
68	KLLAATVLLL	+++
73	KLTLVIIISV	+++
74	KLYDLELIV	+++
76	LLADIGGDPFAA	+
81	NLASFIEQVAV	+
82	NVFDGLVRV	+++
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	++
87	RLFEENDVNL	+++
90	RLLDVLAPLV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+
95	SICNGVPMV	++
97	SLLPQLIEV	+++
100	SLVGDIGNVNM	+++
103	SMGDHLWVA	+
105	SVYDGKLLI	+
106	TLAAIIHGA	++
107	TLGQFYQEVE	+++
109	TLYALSHAV	+++
110	TVGGSEILFEV	+++
113	VLMDKLVEL	+++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	++
117	YAFPKSITV	+
119	YLDKNLTVSV	++
120	YLGEETYVKA	+++
124	LLIDVVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	+++
129	SQADVIPAV	++
130	ALDAGAVYTL	++
132	ALHEEVVGV	++
141	AMGEKSFSV	+
142	AVIGGLIYV	+++
145	FLIAEYFEHV	++
146	FLWTEQAHTV	++
148	GLFAPLVFL	+

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Expresión del gen
149	GLLSGLDIMEV	+++
154	KLTDHLKYV	+++
157	QLLPNLRAV	+
158	RIISGLVKV	++
160	RLLAKIICL	+++
163	RLTESVLYL	++
165	RVIEHVEQV	++
168	SLAVLVPIV	+++
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
175	TLFEHLPHI	++
177	VLDEPYEKV	++
182	YLLHFPMAL	+++
183	YLYNNEEQVGL	+++
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+
200	AYLLQPSQF	+++
204	KYRLTYAYF	+++
206	KWPETPLLL	+
215	IYTGNISSF	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAIRQI	+++
228	YLITSVELL	+
233	ALLGKLDAI	+
249	LLLGERVAL	+
255	SLFGQDVKAV	+
259	TLITDGMRSV	+
263	VLYPSLKEI	+
273	AILETAPKEV	+
275	ALIEGAGILL	+
286	KVLDKVFRA	+
296	SLLSGRISTL	+
298	TMAKESSIIGV	+
301	VLADEFGARV	++
302	KIQEILTQV	+
315	KVLDGSPIEV	++
318	KLNEINEKI	+++
320	GLADNTVIAKV	+
324	RLFETKITQV	++
327	GLNEEIARV	+
336	YLPTFFLTV	+
341	YLAIGIHEL	++
345	SYNPLWLRI (A*24)	++

Intercambio de ligandos facilitado por UV/unión del péptido al HLA-A*02 y al HLA-A*24

- Los péptidos candidatos para los tratamientos a base de linfocitos T acordes con la presente revelación 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 (β 2m) de los complejos MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo siguiendo la descripción general de Rodenko y cols. (Rodenko et al., 2006).

- Se incubaron a temperatura ambiente placas de 96 pocillos MAXISorp (NUNC) hasta el día siguiente con una solución de tapizado consistente en estreptavidina 2 μ g/ml en PBS, a continuación, se lavaron 4 veces

y se procedió al bloqueo durante 1 h a 37 °C con un tampón de bloqueo que contenía BSA al 2%. Como patrones se emplearon monómeros HLA-A*0201/MLA-001 replegados, en el intervalo de 15 a 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC resultantes de la reacción de intercambio por UV se diluyeron a 1:100 con tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se 5 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 10 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 8: niveles de unión a MHC de clase I

15 Según el porcentaje del intercambio de péptidos, la unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I al HLA-A*02 o al HLA-A*02:24 varió entre: ≥10% = +; ≥20% = ++; ≥50 = +++; ≥ 75% = +++. S* = fosfoserina.

Seq ID	Secuencia	Intercambio del péptido
47	FLDTPIAKV	"++"

EJEMPLO 4

20 **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) 25 cargadas con complejos péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo los inventores han podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 22 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 de la revelación, lo cual demuestra que estos péptidos son epítopos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en humanos (Tabla 11).

30 **Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+**

Para llevar a cabo estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con complejo de péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, los inventores primero aislaron linfocitos T CD8+ de productos de leuocoféresis HLA-A*02 por selección positiva con microperlas de CD8 (Miltenyi 35 Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) de donantes sanos obtenidas de la Clínica universitaria de Mannheim, Alemania, tras el preceptivo consentimiento informado.

Los linfocitos CD8+ aislados y las PBMC se incubaron hasta su utilización en medio para linfocitos T (TCM) consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano 40 termoinactivado al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml / estreptomicina 100 µg/ml (Cambrex, Colonia, Alemania), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemania), gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). En este paso al medio TCM también se le añadieron IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Novartis Pharma, Nuremberg, Alemania).

45 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.

50 El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3 (Jung et al., 1987), 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.).

55 Los pMHC usados en las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5),

respectivamente.

Placas de 96 pocillos se tapizaron con 800.000 microperlas / 200 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).

25 Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de CHC

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

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

35 Los linfocitos T CD8+ fueron estimulados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-A*02 formando un complejo con el péptido IMA-APOB-002 (SEQ ID N.º 7) (A, recuadro derecho), el péptido IMA-APOB-003 (B, recuadro derecho, SEQ ID N.º 1) o el péptido IMA-ALDH1L1-001 (C, recuadro derecho, SEQ ID N.º 2), respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D de los multímeros con A*02/APOB-002 (A) o A*02/APOB-003 (B) o A*02/ALDH1 L1-001. Los recuadros de la izquierda (A, B y C) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos A*02/péptido irrelevantes. Los linfocitos CD8+ se seleccionaron entre las células en singlete viables. La aplicación de operadores booleanos ayudó a excluir los falsos positivos detectados con los multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de células multímero+ específicas entre los linfocitos CD8+.

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

50 Los linfocitos T CD8+ fueron estimulados con APC artificiales cubiertas con AcM anti-CD28 y HLA-A*24 formando un complejo con el péptido IMA-KLHL24-001 (SEQ ID N.º 190) (A, recuadro derecho) o el péptido IMA-APOB-006 (B, recuadro derecho, SEQ ID N.º 218), respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción 2D de los multímeros con A*24/ KLHL24-001 (A) o A*24/ APOB-006 (B). Los recuadros de la izquierda (A y B) muestran la tinción de control de células estimuladas con complejos A*24/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+.

Ejemplo 5: Síntesis de péptidos

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

5 **Lista de referencias bibliográficas**

- 10 Adler, A. S. et al., *Genes Dev.* **28** (2014)
 Ahn, Y. H. et al., *J Proteomics.* **106** (2014)
 Akiyama, H. et al., *Oncol Rep.* **21** (2009)
 Alam, S. M. et al., *Endocr.Relat Cancer* **16** (2009)
 Aleman, G. et al., *Am J Physiol Endocrinol.Metab* **289** (2005)
 Alexanian, A. et al., *Cancer Genomics Proteomics.* **9** (2012)
 15 Altenhofer, S. et al., *J Biol.Chem.* **285** (2010)
 Alvarez, C. et al., *J Biol.Chem.* **276** (2001)
 Ammerpohl, O. et al., *Int.J Cancer* **130** (2012)
 Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012)
 Arai, E. et al., *Carcinogenesis* **33** (2012)
 20 Araki, T. et al., *J Biol.Chem.* **286** (2011)
 Arlt, A. et al., *Oncogene* **28** (2009)
 Arndt, S. et al., *Oncol Rep.* **18** (2007)
 Arner, E. S. et al., *Eur.J Biochem.* **267** (2000)
 25 Atienza, J. M. et al., *Mol Cancer Ther* **4** (2005)
 Avery-Kiejda, K. A. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014)
 Bachmann, S. B. et al., *Mol Cancer* **13** (2014)
 Balogh, K. et al., *Oncogene* **31** (2012)
 Bani, M. R. et al., *Mol Cancer Ther* **3** (2004)
 30 Bansal, N. et al., *PLoS.One.* **6** (2011)
 Barbarulo, A. et al., *Oncogene* **32** (2013)
 Bell, J. C. et al., *Drug Metab Dispos.* **40** (2012)
 Ben-Izhak, O. et al., *Histopathology* **41** (2002)
 Bergada, L. et al., *Lab Invest* **94** (2014)
 Bergeron, M. J. et al., *Mol Aspects Med.* **34** (2013)
 35 Bhattacharya, C. et al., *Mol Cancer* **11** (2012)
 Bhogaraju, S. et al., *Science* **341** (2013)
 Bidkhori, G. et al., *PLoS.One.* **8** (2013)
 Bieche, I. et al., *Breast Cancer Res* **6** (2004)
 Biswas, S. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1832** (2013)
 40 Blanke, K. L. et al., *Cancer Causes Control* **25** (2014)
 Bodine, S. C. et al., *Science* **294** (2001)
 Boehringer, J. et al., *Biochem.J* **448** (2012)
 Bojjireddy, N. et al., *J Cell Sci.* (2014)
 45 Booth, D. G. et al., *EMBO J* **30** (2011)
 Bouquet, C. et al., *Mol Ther* **14** (2006)
 Boylan, K. L. et al., *Proteome.Sci.* **8** (2010)
 Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
 Brockmoller, S. F. et al., *J Proteome.Res* **11** (2012)
 50 Buch, S. C. et al., *Mol Carcinog.* **51 Suppl 1** (2012)
 Bull, C. et al., *Cancer Res* **74** (2014)
 Burrell, R. A. et al., *Nature* **494** (2013)
 Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006)
 Butterfield, L. H. et al., *Clin.Cancer Res.* **9** (2003)
 Byrne, A. et al., *Exp.Cell Res* **316** (2010)
 55 Cadenas, C. et al., *Cell Cycle* **13** (2014)
 Cadoret, A. et al., *Oncogene* **21** (2002)
 Cao, H. et al., *Biochemistry* **41** (2002)
 Cao, Y. et al., *Cancer Research* **61** (2001)
 Cao-Ehlker, X. et al., *J Biol.Chem.* **288** (2013)
 60 Carroll, M. et al., *J Interferon Cytokine Res* **33** (2013)
 Carrouel, F. et al., *J Dent.Res* **87** (2008)
 Castro, M. et al., *J Transl.Med.* **8** (2010)
 Chae, Y. S. et al., *Med.Oncol* **28** (2011)
 Chang, L. O. et al., *Cancer Res* **33** (1973)
 65 Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **59** (2007)

- Chapiro, J. et al., Radiol.Med. **119** (2014)
 Charbonneau, B. et al., Am J Hematol. **87** (2012)
 Chatterjee, M. et al., Haematologica **98** (2013)
 5 Chen, J. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **420** (2012a)
 Chen, M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **108** (2011a)
 Chen, R. et al., World J Gastroenterol. **17** (2011b)
 Chen, X. et al., J Dig.Dis. **12** (2011c)
 Chen, X. Q. et al., Med.Oncol **29** (2012b)
 10 Cheng, L. et al., Genomics **102** (2013)
 Choi, Y. W. et al., Int.J Gynecol.Cancer **17** (2007)
 Christa, L. et al., Gastroenterology **106** (1994)
 Clark, A. G. et al., Cytoskeleton (Hoboken.) **69** (2012)
 Claro da, Silva T. et al., Mol.Aspects Med. **34** (2013)
 Cohen, L. et al., Nature **395** (1998)
 15 Collins, C. L. et al., Surgery **122** (1997)
 Com, E. et al., J Proteomics. **75** (2012)
 Coppers, K. D. et al., Diabetologia **55** (2012)
 Cornen, S. et al., PLoS.ONE. **9** (2014)
 Cornez, I. et al., Biochem.Pharmacol. **75** (2008)
 20 Cowling, V. H., Oncogene **29** (2010)
 Cui, T. et al., Int.J Oncol **39** (2011)
 da Silva, M. G. et al., Exp.Clin Cardiol. **17** (2012)
 Dadkhah, E. et al., Arch.Iran Med. **16** (2013)
 25 Darmanis, S. et al., PLoS.One. **8** (2013)
 Darvekar, S. et al., Biochem.J **442** (2012)
 Darvekar, S. R. et al., PLoS.One. **9** (2014)
 Datta, K. et al., J Biol.Chem. **284** (2009)
 David, S. et al., Front Biosci.(Elite.Ed) **5** (2013)
 30 de Almagro, M. C. et al., Biochem.Pharmacol. **81** (2011)
 de Groot, J. F. et al., Cancer Res **65** (2005)
 Deb, S. et al., Br.J Cancer **110** (2014)
 Debauve, G. et al., Cell Mol Life Sci. **65** (2008)
 Decker, T. et al., J Clin Invest **109** (2002)
 35 Decock, A. et al., Genome Biol. **13** (2012)
 Del Campo, E. M. et al., Mol Phylogenet.Evol. **66** (2013)
 Delaval, B. et al., J Cell Biol. **188** (2010)
 Deng, X. D. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **15** (2014)
 Di, Gregorio E. et al., J Med.Genet. **50** (2013)
 40 Diggle, C. P. et al., PLoS.Genet. **10** (2014)
 Dimitrov, A. et al., Hum.Mol Genet. **18** (2009)
 Dmitriev, O. Y., Biochem.Cell Biol. **89** (2011)
 Doherty, J. A. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **20** (2011)
 Dong, Z. et al., Crit Rev.Oncol Hematol. **59** (2006)
 45 Dou, R. et al., Cancer Lett. **336** (2013)
 Drazkowska, K. et al., Nucleic Acids Res **41** (2013)
 Edavana, V. K. et al., Drug Metab Dispos. **41** (2013)
 Edwards, P. A. et al., Breast Cancer Res **14** (2012)
 Elvenes, J. et al., PLoS.One. **6** (2011)
 50 Emaduddin, M. et al., Cell Commun.Signal. **6** (2008)
 Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. **6** (2014)
 Epelbaum, R. et al., Pathol.Oncol Res **4** (1998)
 Fan, T. W. et al., Mol Cancer **8** (2009)
 Fang, Z. Q. et al., Genet.Mol Res **12** (2013)
 55 Fassas, A. B. et al., Leuk.Lymphoma **45** (2004)
 Feferman, L. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **16** (2013)
 Fei, F. et al., J Cancer Res Clin Oncol (2014a)
 Fei, F. et al., Ann Surg.Oncol **21** (2014b)
 Feigelson, H. S. et al., Breast Cancer Res **10** (2008)
 60 Feng, L. et al., Cell Biochem.Funct. **29** (2011)
 Feng, M. et al., J Clin Invest **124** (2014a)
 Feng, S. et al., Int.J Biol.Sci. **9** (2013)
 Feng, Y. et al., J Biol.Chem. **289** (2014b)
 Feng, Y. et al., Free Radic.Res **46** (2012)
 Fernandes, C. F. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **361** (2007)
 65 Ferre, S. et al., J Am Soc Nephrol. **25** (2014)
 Ferrer-Ferrer, M. et al., Arch.Med.Res **44** (2013)

- 5 Filmus, J. et al., *FEBS J* **280** (2013)
 Fiorito, V. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1839** (2014)
 Fojo, A. T. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84** (1987)
 Fonseca, A. L. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **51** (2012)
 10 Fosdal, G. et al., *ScientificWorldJournal*. **2012** (2012)
 Fournier, T. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1482** (2000)
 Fu, W. et al., *J Cell Sci.* **123** (2010)
 Fujitomo, T. et al., *Cancer Res* **72** (2012)
 Furukawa, T. et al., *Sci.Rep.* **1** (2011)
 15 Furutani, M. et al., *Hepatology* **24** (1996)
 Gadd, S. et al., *Lab Invest* **90** (2010)
 Gailani, D., *Trends Cardiovasc.Med.* **10** (2000)
 Galamb, O. et al., *Helicobacter*. **13** (2008)
 Galazis, N. et al., *Gynecol.Endocrinol.* **29** (2013)
 20 Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013)
 Gao, L. et al., *Mol Oncol* **6** (2012)
 Garcia-Baquero, R. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014)
 Gardner-Stephen, D. A. et al., *Drug Metab Dispos.* **35** (2007)
 Garg, M. et al., *Cancer* **116** (2010a)
 25 Garg, M. et al., *Eur.J Cancer* **46** (2010b)
 Gburcik, V. et al., *Mol Cell Biol.* **25** (2005)
 Gergely, F. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** (2000)
 Gervasini, G. et al., *Cancer* **107** (2006)
 30 Getty, A. L. et al., *Cell Mol Life Sci.* **68** (2011)
 Gilabert, M. et al., *J Cell Physiol* **228** (2013)
 Gilkes, D. M. et al., *Mol Cancer Res* **11** (2013)
 Giovannetti, E. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **106** (2014)
 Gokmen-Polar, Y. et al., *Mod.Pathol.* (2014)
 35 Goldstein, I. et al., *Carcinogenesis* **34** (2013)
 Gong, Y. et al., *Genet.Mol Res* **12** (2013)
 Goode, E. L. et al., *Clin Cancer Res* **16** (2010)
 Gordon, E. M. et al., *Am.J Pediatr.Hematol.Oncol* **15** (1993)
 40 Gotzmann, J. et al., *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **9** (1999)
 Gray, L. R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **71** (2014)
 Gregory, P. A. et al., *J Biol.Chem.* **278** (2003)
 45 Greif, P. A. et al., *Leukemia* **25** (2011)
 Gu, W. et al., *PLoS.One.* **7** (2012)
 Guo, L. et al., *Cancer Sci.* **103** (2012)
 Halon, A. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **287** (2013)
 50 Hamamoto, R. et al., *Cancer Sci.* **97** (2006)
 Hamilton, S. R. et al., *Glycobiology* **15** (2005)
 Hamm, A. et al., *BMC.Cancer* **8** (2008)
 Hanioka, N. et al., *Basic Clin Pharmacol.Toxicol.* **110** (2012)
 Harris, M. et al., *Pharmacogenet.Genomics* **24** (2014)
 55 Hatakeyama, H. et al., *Proteomics*. **6** (2006)
 Havens, M. A. et al., *PLoS.Genet.* **10** (2014)
 He, P. et al., *Hum.Pathol.* **35** (2004)
 He, X. et al., *Neoplasma* **61** (2014a)
 He, Y. et al., *Mol Carcinog.* (2014b)
 Hellwinkel, O. J. et al., *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* **14** (2011)
 60 Hemmingsson, O. et al., *Oncol Rep.* **22** (2009)
 Hidalgo-Curtis, C. et al., *Br.J Haematol.* **148** (2010)
 Hider, J. L. et al., *BMC.Evol.Biol.* **13** (2013)
 Hinsch, N. et al., *BMC.Cancer* **9** (2009)
 Hirota, Y. et al., *Nucleic Acids Res* **28** (2000)
 Hlavata, I. et al., *Mutagenesis* **27** (2012)
 65 Hoelz, D. J. et al., *Proteomics*. **6** (2006)
 Holden, H. M. et al., *Cell Mol Life Sci.* **61** (2004)
 Honda, K. et al., *PLoS.One.* **7** (2012)
 Hong, Y. et al., *J Biol.Chem.* **274** (1999)
 Hood, F. E. et al., *Bioarchitecture*. **1** (2011)
 Hood, F. E. et al., *J Cell Biol.* **202** (2013)
 Hopfer, O. et al., *Br.J Cancer* **93** (2005)
 Horani, A. et al., *Am J Hum.Genet.* **91** (2012)
 Hou, M. et al., *Int.J Mol Med.* **33** (2014)
 Hu, D. G. et al., *Drug Metab Rev.* **46** (2014)

- Hua, D. et al., *Int.J Mol Med.* **30** (2012a)
 Hua, T. et al., *J Biol.Chem.* **287** (2012b)
 Huang, O. et al., *Jpn.J Clin Oncol* **43** (2013)
 Huang, S. et al., *Oncogene* **21** (2002)
 Huang, Y. et al., *Oncotarget* **5** (2014)
 Hughes, H. et al., *J Cell Sci.* **123** (2010)
 Hunecke, D. et al., *J Pathol.* **228** (2012)
 Huopaniemi, L. et al., *Glycobiology* **14** (2004)
 Hyung, S. W. et al., *Mol Cell Proteomics.* **10** (2011)
 Iannitti, T. et al., *Mar.Drugs* **8** (2010)
 Ichida, K. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **282** (2001)
 Ignatova, I. D. et al., *Am J Physiol Endocrinol.Metab* **296** (2009)
 Ikeda, R. et al., *Int.J Oncol* **38** (2011)
 Inuzuka, M. et al., *J Biol.Chem.* **280** (2005)
 Ishiguro, H. et al., *Oncogene* **21** (2002)
 Ishizaki, F. et al., *Sci.Rep.* **3** (2013)
 Ivashchenko, A. T. et al., *Biomed.Res Int.* **2013** (2013)
 Jacquemier, J. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
 Jacques, C. et al., *Br.J Cancer* **101** (2009)
 Jaffe, E. K. et al., *Arch.Biochem.Biophys.* **530** (2013)
 Jakobsson, A. et al., *Prog.Lipid Res* **45** (2006)
 Jamroziak, K. et al., *Eur.J Haematol.* **72** (2004)
 Jeung, H. C. et al., *Oncologist* **12** (2007)
 Jia, Y. et al., *Br.J Cancer* **110** (2014)
 Jiang, J. G. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
 Jiang, X. et al., *Histol.Histopathol.* **25** (2010)
 Jiang, X. et al., *Mol Carcinog.* (2014)
 Jin, Z. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014)
 Jockusch, H. et al., *Proteomics* **14** (2014)
 Johnson, M. A. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **1012** (2004)
 Jose-Eneriz, E. S. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008)
 Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987)
 Jung, H. J. et al., *J Mol Med.(Berl)* **91** (2013)
 Kaira, K. et al., *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.* **13** (2014)
 Kalsotra, A. et al., *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **199** (2004)
 Kalthoff, S. et al., *J Biol.Chem.* **285** (2010)
 Kamiyama, S. et al., *Glycobiology* **21** (2011)
 Kamiyama, S. et al., *J Biol.Chem.* **281** (2006)
 Kandil, D. H. et al., *Adv.Anat.Pathol.* **16** (2009)
 Kandimalla, R. et al., *Nat Rev.Urol.* **10** (2013)
 Karvonen, U. et al., *J Mol Biol.* **382** (2008)
 Kelleher, D. J. et al., *Glycobiology* **16** (2006)
 Khan, A. P. et al., *Neoplasia.* **15** (2013)
 Kim, Y. et al., *Hum.Pathol.* **46** (2015)
 Kim, Y. W. et al., *PLoS.One.* **7** (2012)
 Klein, C. J. et al., *Neurology* **82** (2014)
 Kobayashi, T. et al., *Biochem.J* **400** (2006)
 Kollmann, K. et al., *Cancer Cell* **24** (2013)
 Komatsu, M. et al., *Pharmacol.Res* **66** (2012)
 Kong, S. Y. et al., *Cancer Sci.* **99** (2008)
 Kovacevic, Z. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1783** (2008)
 Kracmarova, A. et al., *Leuk.Lymphoma* **49** (2008)
 Kraemer, N. et al., *Cell Mol Life Sci.* **68** (2011)
 Kress, T. R. et al., *Mol Cell* **41** (2011)
 Krohn, A. et al., *J Pathol.* **231** (2013)
 Krupenko, S. A. et al., *Cell Growth Differ.* **13** (2002)
 Kubota, H. et al., *Cell Stress.Chaperones.* **15** (2010)
 Kummel, D. et al., *EMBO Rep.* **6** (2005)
 Kunutsor, S. K. et al., *Int.J Cancer* (2014)
 Kuriyama, H. et al., *Gene* **253** (2000)
 Laezza, F. et al., *Mol Cell Neurosci.* **34** (2007)
 Lahiri, S. et al., *PLoS.Biol.* **12** (2014)
 Lando, M. et al., *J Pathol.* **230** (2013)
 Lapucci, A. et al., *FASEB J* **24** (2010)
 Lascorz, J. et al., *BMC.Med.Genet.* **13** (2012)
 Lauffart, B. et al., *BMC.Womens Health* **5** (2005)

- 5 Laverdiere, I. et al., *Endocr.Relat Cancer* (2014)
 Leasure, C. D. et al., *Plant Physiol* **150** (2009)
 Lee, C. H. et al., *Hum.Reprod.* **24** (2009)
 Lee, K. W. et al., *J Biol.Chem.* **288** (2013)
 Lee, S. J. et al., *Toxicol.Lett.* (2014)
 Lee, W. C. et al., *J Immunother.* **28** (2005)
 Lee, Y. C. et al., *Int.J Cancer* **122** (2008)
 Lekva, T. et al., *PLoS.One.* **8** (2013)
 LeRoy, P. J. et al., *Cancer Res* **67** (2007)
 10 Leung, T. et al., *Breast Cancer Res* **15** (2013)
 Levenson, V. V. et al., *Somat.Cell Mol Genet.* **25** (1999)
 Levi, S. et al., *Front Pharmacol.* **5** (2014)
 Li, D. et al., *Protein Cell* **5** (2014a)
 Li, N. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **455** (2014)
 15 Li, X. et al., *Med.Oncol* **31** (2014b)
 Li, Y. et al., *Mol Cell Biol.* **29** (2009)
 Li, Y. H. et al., *World J Gastroenterol.* **18** (2012)
 Liang, J. et al., *PLoS.One.* **3** (2008)
 Lillig, C. H. et al., *Antioxid.Redox.Signal.* **9** (2007)
 20 Lin, C. H. et al., *J Cell Biol.* **189** (2010)
 Lin, M. C. et al., *Oral Oncol* **50** (2014)
 Lin, S. H. et al., *Oncogene* **23** (2004)
 Lin, Z. et al., *Cell Rep.* **5** (2013)
 Linderoth, J. et al., *Br.J Haematol.* **141** (2008)
 25 Line, A. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **51** (2002)
 Ling, C. et al., *EMBO J* **26** (2007)
 Linge, A. et al., *J Proteome.Res* **13** (2014)
 Lioutas, A. et al., *EMBO Rep.* **14** (2013)
 Liu, C. et al., *Nat Med.* **20** (2014)
 30 Liu, C. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **105** (2013a)
 Liu, H. et al., *Carcinogenesis* **34** (2013b)
 Liu, T. W. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106** (2009a)
 Liu, W. et al., *J Biol.Chem.* **279** (2004)
 Liu, Y. et al., *Curr.Drug Targets.* **13** (2012)
 35 Liu, Y. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **18** (2009b)
 Liu, Y. et al., *Oncol Rep.* **18** (2007)
 Ljungberg, B., *Curr.Opin.Urol.* **17** (2007)
 Llovet, J. M. et al., *N.Engl.J Med.* **359** (2008)
 Lo Re, A. E. et al., *J Biol.Chem.* **287** (2012)
 40 Lo, W. Y. et al., *J Proteome.Res* **6** (2007)
 Lombardo, Y. et al., *Breast Cancer Res* **16** (2014)
 Lourenco, G. J. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **100** (2006)
 Lovelace, L. L. et al., *J Biol.Chem.* **286** (2011)
 Lung, H. L. et al., *Int J Cancer* **127** (2010)
 45 Lutcke, H., *Eur.J Biochem.* **228** (1995)
 Ma, X. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003)
 Mackiewicz, A. et al., *Glycoconj.J* **12** (1995)
 Mahajan, K. et al., *Cancer Lett.* **338** (2013)
 Mamiani, M. et al., *BMC.Res Notes* **5** (2012)
 50 Mariani, L. et al., *Clin Cancer Res* **7** (2001)
 Marina, M. et al., *Front Biosci.(Landmark.Ed)* **19** (2014)
 Markiewski, M. M. et al., *Nat Immunol* **9** (2008)
 Martin, T. A. et al., *Eur.J Cancer* **40** (2004)
 55 Martinez, H. D. et al., *Genes Cancer* **2** (2011)
 Mathison, J. et al., *Pathobiology* **59** (1991)
 Matsubara, J. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **20** (2011)
 Matusiak, D. et al., *J Histochem.Cytochem.* **55** (2007)
 McGuire, T. A., *Md Med.J* **40** (1991)
 60 Medjkane, S. et al., *Cell Cycle* **11** (2012)
 Meijers, J. C. et al., *Br.J Haematol.* **108** (2000)
 Mercer, C. A. et al., *Autophagy* **5** (2009)
 Mercurio, F. A. et al., *Biochemistry* **51** (2012)
 Midorikawa, Y. et al., *Jpn.J Cancer Res.* **93** (2002)
 Miled, C. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
 65 Milkereit, P. et al., *J Biol.Chem.* **278** (2003)
 Miller, J. C. et al., *Mol Carcinog.* **48** (2009)

- 5 Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Pancreas* **42** (2013)
 Monaco, M. E. et al., *Transl.Oncol* **3** (2010)
 Morandi, F. et al., *PLoS.One* **7** (2012)
 Morrissey, J. J. et al., *Urology* **83** (2014)
 Mu, J. et al., *J Biol.Chem.* **272** (1997)
 Murray, D. W. et al., *Br.J Cancer* **110** (2014)
 Murray, J. I. et al., *Mol Biol.Cell* **15** (2004)
 Murrin, L. C. et al., *J Neuroimmune.Pharmacol.* **2** (2007)
 Murthy, K. G. et al., *Genes Dev.* **9** (1995)
 10 Mydlíkova, Z. et al., *Neoplasma* **57** (2010)
 Narita, T. et al., *Mol Cell Biol.* **23** (2003)
 Narjoz, C. et al., *PLoS.One* **9** (2014)
 Nelson, E. R. et al., *Science* **342** (2013)
 Ngeow, J. et al., *Cancer Discov.* **4** (2014)
 15 Nibbe, R. K. et al., *Mol.Cell Proteomics.* **8** (2009)
 Nielsen, M. J. et al., *Blood* **108** (2006)
 Noda, T. et al., *Hepatology* **55** (2012)
 Noh, C. K. et al., *Clin Biochem.* **47** (2014)
 20 Ntikoudi, E. et al., *Cancer Treat.Rev.* **40** (2014)
 Nwosu, V. et al., *Hum.Mol Genet.* **10** (2001)
 Obholz, K. L. et al., *Dev.Biol.* **298** (2006)
 Oeffner, F. et al., *Am J Hum.Genet.* **84** (2009)
 Ofman, R. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **281** (2001)
 25 Ohshima, K. et al., *Mol Biol.Evol.* **27** (2010)
 Oiso, S. et al., *Oncol Rep.* **31** (2014)
 Oji, Y. et al., *Int.J Oncol* **44** (2014)
 Osada, H. et al., *Int.J Cancer* **112** (2004)
 30 Otero-Rey, E. M. et al., *Oral Oncol* **44** (2008)
 Palmer, D. H. et al., *Hepatology* **49** (2009)
 Panico, F. et al., *Adv.Cancer Res* **105** (2009)
 Park, B. L. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **363** (2007)
 35 Patel, M. R. et al., *Laryngoscope* **121** (2011)
 Patel, S. A. et al., *Br.J Cancer* (2014)
 Pattani, K. M. et al., *PLoS.ONE* **7** (2012)
 Pavlec, D. M. et al., *Genetics* **183** (2009)
 Pawlowska, M. et al., *Drug Metab Dispos.* **41** (2013)
 40 Pehlivan, D. et al., *Eur.J Hum.Genet.* **22** (2014)
 Pei, Z. et al., *PLoS.One* **8** (2013)
 Pellanda, H. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol.* **44** (2012)
 Peng, R. et al., *J Cell Biol.* **157** (2002)
 Perera, S. et al., *J Muscle Res Cell Motil.* **33** (2012)
 Persaud-Sawin, D. A. et al., *Hum.Mol Genet.* **11** (2002)
 Peters, D. G. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14** (2005)
 45 Pizon, V. et al., *J Cell Sci.* **115** (2002)
 Placke, T. et al., *Blood* **124** (2014)
 Plebani, R. et al., *Neoplasia* **14** (2012)
 Poh, W. et al., *Mol Cancer* **11** (2012)
 Porkka, K. P. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **39** (2004)
 Pylypenko, O. et al., *Mol Cell* **11** (2003)
 50 Qi, L. et al., *Cancer Res* **74** (2014)
 Qin, Y. et al., *Pigment Cell Melanoma Res* **26** (2013)
 Quayle, S. N. et al., *Neuro Oncol* **14** (2012)
 Quek, H. H. et al., *DNA Cell Biol.* **16** (1997)
 Quidville, V. et al., *Cancer Res* **73** (2013)
 55 Rajadhyaksha, A. M. et al., *Am.J Hum.Genet.* **87** (2010)
 Rajasekaran, A. K. et al., *Nucleic Acids Res* **23** (1995)
 Rajendran, M. et al., *Cancer Metastasis Rev.* **29** (2010)
 Rakheja, D. et al., *Mol Genet.Metab* **93** (2008)
 Ramana, C. V. et al., *EMBO J* **19** (2000)
 60 Rashad, N. M. et al., *Cytokine* **68** (2014)
 Rath, N. et al., *EMBO Rep.* **13** (2012)
 Recupero, D. et al., *Rom.J Morphol.Embryol.* **51** (2010)
 Reinisch, W. et al., *J Immunother.* **25** (2002)
 Rekdal, C. et al., *J Biol.Chem.* **275** (2000)
 65 Ren, Y. G. et al., *Mol Biol.Cell* **15** (2004)
 Rennoll, S. A. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **443** (2014)

- 5 Rifas, L. et al., *Arthritis Rheum.* **60** (2009)
 Riihila, P. M. et al., *J Invest Dermatol.* **134** (2014)
 Rodriguez, F. J. et al., *J Neuropathol.Exp.Neurol.* **67** (2008)
 Rogov, V. et al., *Mol Cell* **53** (2014)
 Romanuik, T. L. et al., *BMC.Genomics* **10** (2009)
 Roodman, G. D., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **1192** (2010)
 Rosado, I. V. et al., *RNA* **10** (2004)
 Rose, A. E. et al., *Cancer Res* **71** (2011)
 10 Ross, H. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* **136** (2012)
 Rossi, M. R. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* **161** (2005)
 Rotondo, R. et al., *Int.J Cancer* **125** (2009)
 Rucksaken, R. et al., *Cancer Biomark.* **12** (2012)
 Ruiz, F. X. et al., *Biochem.J* **440** (2011)
 Ruiz, F. X. et al., *Front Pharmacol.* **3** (2012)
 15 Rutkowski, M. J. et al., *Mol Cancer Res* **8** (2010)
 Rylova, S. N. et al., *Cancer Res* **62** (2002)
 Sahm, F. et al., *Cancer Res* **73** (2013)
 Sahu, A. et al., *Immunol Res* **17** (1998)
 Saito, T. et al., *J Biol.Chem.* **278** (2003)
 20 Salahshor, S. et al., *J Clin Pathol.* **58** (2005)
 Sang, W. et al., *Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi.* **42** (2013)
 Sangro, B. et al., *J Clin Oncol* **22** (2004)
 Sanz, L. et al., *Mol Cell Biol.* **15** (1995)
 25 Saponaro, C. et al., *Cancer Biomark.* **14** (2014)
 Sarajlic, A. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **143** (2014)
 Sasahira, T. et al., *Eur.J Cancer* **50** (2014)
 Schneider, E. et al., *Clin Chim.Acta* **374** (2006)
 Schofield, A. V. et al., *Crit Rev.Biochem.Mol Biol.* **48** (2013)
 Schulz, E. G. et al., *Immunity* **30** (2009)
 30 Seifert, M. et al., *J Pathol.* **205** (2005)
 Senchenko, V. et al., *Oncogene* **22** (2003)
 Shaughnessy, J. D., Jr. et al., *Blood* **118** (2011)
 Shen, F. et al., *J Cell Biochem.* **112** (2011)
 Shi, M. et al., *World J Gastroenterol.* **10** (2004a)
 35 Shi, Y. et al., *Exp.Cell Res* **296** (2004b)
 Shi, Z. Z. et al., *Clin Transl.Oncol* **16** (2014)
 Shinji, S. et al., *Oncol Rep.* **15** (2006)
 Shodeinde, A. et al., *J Mol Biochem.* **2** (2013)
 Shubbar, E. et al., *BMC.Cancer* **13** (2013)
 40 Shurbaji, M. S. et al., *Am J Clin Pathol.* **96** (1991)
 Sillars-Hardebol, A. H. et al., *Gut* **61** (2012)
 Singh, S. et al., *Tumour.Biol.* (2014)
 Smith, P. et al., *Clin Cancer Res* **13** (2007)
 Song, C. et al., *J Biol.Chem.* **288** (2013)
 45 Srivenugopal, K. S. et al., *Cancer Lett.* **117** (1997)
 Staal-van den Brekel AJ et al., *Br.J Cancer* **76** (1997)
 Steen, H. C. et al., *J Interferon Cytokine Res.* **32** (2012)
 Stefanska, B. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014)
 50 Strassburg, C. P. et al., *J Biol.Chem.* **273** (1998)
 Strassburg, C. P. et al., *Mol Pharmacol.* **52** (1997)
 Sudo, H. et al., *Genomics* **95** (2010)
 Sugihara, T. et al., *J Biol.Chem.* **276** (2001)
 Sun, C. et al., *Pathol.Res Pract.* **210** (2014)
 Sun, X. et al., *J Pathol.* **226** (2012)
 55 Sun, X. et al., *Protein Cell* **4** (2013)
 Sun, X. J. et al., *Zhonghua Yi.Xue.Yi.Chuan Xue.Za Zhi.* **22** (2005)
 Supernat, A. et al., *Oncol Lett.* **4** (2012)
 Surmacz, E., *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **18** (2013)
 Suzuki, K. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **368** (2008)
 60 Swallow, C. J. et al., *Oncogene* **24** (2005)
 Tabuchi, K. et al., *J Neurosci.* **22** (2002)
 Taguchi, O. et al., *Clin Chim.Acta* **244** (1996)
 Takayama, T. et al., *Cancer* **68** (1991)
 Takayama, T. et al., *Lancet* **356** (2000)
 65 Takeda, Y. et al., *Glycobiology* **24** (2014)
 Takemasa, I. et al., *Int.J Oncol* **40** (2012)

- Takeuchi, A. et al., *Mol Cell Endocrinol.* **384** (2014)
- Tan, L. Z. et al., *Am J Pathol.* **183** (2013)
- Tan, M. K. et al., *Mol Cell Biol.* **31** (2011)
- 5 Tanahashi, N. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **243** (1998)
- Tanaka, M. et al., *Mol Med.Rep.* **7** (2013)
- Tang, L. et al., *Arch.Med.Res* **43** (2012)
- Tang, X. H. et al., *Annu.Rev.Pathol.* **6** (2011)
- Tao, J. et al., *Sci.Transl.Med.* **3** (2011)
- 10 Tao, R. H. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **341** (2006)
- Tao, T. et al., *Cell Res* **23** (2013)
- Tarao, K. et al., *Cancer* **86** (1999)
- Tarao, K. et al., *Cancer* **79** (1997)
- 15 Tasker, P. N. et al., *Osteoporos.Int.* **17** (2006)
- Telikicherla, D. et al., *Clin Proteomics.* **9** (2012)
- Tian, T. et al., *Eur.J Cancer* **48** (2012)
- Tian, Y. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014)
- 20 Tomiyama, K. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107** (2010)
- Tomoda, T. et al., *J Gastroenterol.Hepatol.* **27** (2012)
- Tong, J. et al., *PLoS.One.* **8** (2013)
- Tortorella, S. et al., *J Membr.Biol.* **247** (2014)
- 25 Tran, E. et al., *Science* **344** (2014)
- Trougakos, I. P., *Gerontology* **59** (2013)
- Tsai, H. Y. et al., *Oncogene* **32** (2013)
- Uddin, S. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **4** (2011)
- 25 Uehara, Y. et al., *Cancer Res* **43** (1983)
- Urig, S. et al., *Semin.Cancer Biol.* **16** (2006)
- Vainio, P. et al., *Am.J Pathol.* **178** (2011)
- 30 van der Spek, P. J. et al., *Genomics* **31** (1996)
- van Zuylen, W. J. et al., *PLoS.Pathog.* **8** (2012)
- van, den Broek, I et al., *Proteomics.Clin Appl.* **4** (2010)
- van, Duin M. et al., *Haematologica* **96** (2011)
- Vejda, S. et al., *Mol Cell Proteomics.* **1** (2002)
- 35 Vincent, F. et al., *Cancer Res* **69** (2009)
- Wang, B. S. et al., *Cell Stress.Chaperones.* **18** (2013a)
- Wang, D. et al., *J Biol.Chem.* **277** (2002)
- Wang, J. et al., *Eur.J Cancer Prev.* **22** (2013b)
- Wang, J. et al., *J Clin Invest* **112** (2003)
- 40 Wang, J. et al., *Cancer Prev.Res (Phila)* **6** (2013c)
- Wang, J. C. et al., *Oncology* **81** (2011)
- Wang, M. et al., *Chin J Physiol* **55** (2012)
- Wang, S. K. et al., *PLoS.Genet.* **9** (2013d)
- 45 Wang, S. S. et al., *PLoS.One.* **5** (2010)
- Wang, X. et al., *Urol.Int.* **92** (2014)
- Wang, Y. et al., *J Biol.Chem.* **274** (1999)
- Wang, Y. et al., *Med.Oncol* **32** (2015)
- 50 Wazir, U. et al., *Cell Mol Biol.Lett.* **18** (2013)
- Wazir, U. et al., *Anticancer Res* **32** (2012)
- Weiss, J. et al., *Int.J Antimicrob.Agents* **41** (2013)
- Welsh, M. M. et al., *Carcinogenesis* **29** (2008)
- 55 Wieser, R., *Leuk.Lymphoma* **43** (2002)
- Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res.* **64** (2004)
- Williams, A. L. et al., *Nature* **506** (2014)
- Witte, I. et al., *Cell Death.Dis.* **2** (2011)
- 55 Wong, K. K. et al., *Leukemia* **28** (2014)
- Wong, N. et al., *J Hepatol.* **38** (2003)
- Wu, L. et al., *Ann Hematol.* **91** (2012)
- Wu, N. et al., *Int.J Mol Sci.* **14** (2013a)
- 60 Wu, W. et al., *Sci.China Life Sci.* **56** (2013b)
- Wu, X. et al., *Am.J Clin Exp.Urol.* **2** (2014)
- Wu, Y. M. et al., *Cancer Res* **71** (2011)
- Xiao, J. et al., *J Biol.Chem.* **276** (2001)
- 65 Xie, F. W. et al., *Neoplasma* **61** (2014)
- Xu, H. et al., *Cell Rep.* **9** (2014)
- Xu, X. et al., *Proteomics* **10** (2010)
- Yan, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001)
- Yang, C. et al., *Virchows Arch.* **463** (2013)

- Yang, C. Y. et al., *J Immunol* **192** (2014a)
 Yang, H. et al., *Oncol Rep.* **24** (2010)
 Yang, H. W. et al., *Oncogene* **0** (2014b)
 Yang, R. et al., *Mol Cell Biol.* **31** (2011a)
 Yang, Z. J. et al., *Mol Cancer Ther.* **10** (2011b)
 Yau, C. et al., *Breast Cancer Res.* **12** (2010)
 Ye, X. H. et al., *Mol Genet. Genomics* (2014)
 Yoon, J. K. et al., *J Transl. Med.* **12** (2014)
 Yoshimura, S. et al., *J Cell Biol.* **191** (2010)
 5 Yoshizuka, N. et al., *Mol Cancer Res.* **10** (2012)
 Yosten, G. L. et al., *Am J Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* **303** (2012)
 Yu, J. H. et al., *RNA* **11** (2005)
 Yu, K. et al., *PLoS. Genet.* **4** (2008)
 10 Yue, C. et al., *Int. J. Cancer* **136** (2015)
 Zamanian-Daryoush, M. et al., *J Biol. Chem.* **288** (2013)
 Zarling, A. L. et al., *Cancer Res.* **74** (2014)
 Zekri, A. R. et al., *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13** (2012)
 Zelcer, N. et al., *Mol Cell Biol.* **34** (2014)
 15 Zhang, D. et al., *Pak. J. Med. Sci.* **29** (2013a)
 Zhang, H. et al., *Oncotarget.* **4** (2013b)
 Zhang, H. T. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1839** (2014a)
 Zhang, J. et al., *Drug Metab. Dispos.* **34** (2006)
 Zhang, S. et al., *BMC. Cancer* **11** (2011)
 20 Zhang, X. et al., *PLoS. One.* **7** (2012)
 Zhang, X. D. et al., *Int. J. Clin. Exp. Med.* **7** (2014b)
 Zhao, Y. et al., *Cell Death. Dis.* **4** (2013)
 Zhou, B. et al., *Cancer Biol. Ther.* **13** (2012)
 Zhou, D. et al., *PLoS. One.* **8** (2013a)
 Zhou, J. et al., *Oncol Rep.* **30** (2013b)
 25 Zhou, J. et al., *Lung Cancer* **14** (1996)
 Zhu, H. et al., *Cell Stress Chaperones.* (2014a)
 Zhu, W. L. et al., *Anticancer Res.* **29** (2009)
 Zhu, X. et al., *Biomed. Pharmacother.* **68** (2014b)
 Zhuang, Z. et al., *J Neurosurg.* **115** (2011)
 30 Zietek, Z. et al., *Pol. Tyg. Lek.* **51** (1996)
 Zou, W. et al., *Cancer Sci.* **101** (2010)
 Zu, X. et al., *Molecules.* **18** (2013)
 Zu, X. Y. et al., *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **7** (2012)
 35 Zynda, E. R. et al., *Cell Cycle* **13** (2014)
 40

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Immatics Biotechnologies GmbH
- 45 <120> Nuevos péptidos y nueva combinación de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el carcinoma hepatocelular (CHC) y otros tipos de cáncer
- <130> I32728WOEP-B
- 50 <150> GB1423016.3
 <151> 23-12-2014
- <150> US62/096.165
 <151> 23-12-2014
- 55 <150> GB1501017.6
 <151> 21-01-2015
- <160> 348
- 60 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 9
- 65 <212> PRT

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 7

Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Phe Val
 1 5

10 <210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 8

Lys Leu Leu Glu Glu Ala Thr Ile Ser Val
 1 5 10

20 <210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 9

Ala Leu Ala Asn Gln Lys Leu Tyr Ser Val
 1 5 10

30 <210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 10

Ser Leu Leu Glu Glu Phe Asp Phe His Val
 1 5 10

40 <210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 11

Ser Leu Ser Gln Glu Leu Val Gly Val
 1 5

50 <210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu
 1 5

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 13

Gly Leu Ile Asp Thr Glu Thr Ala Met Lys Ala Val
 1 5 10

10 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 14

Ala Leu Ala Asp Leu Thr Gly Thr Val Val
 1 5 10

20 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

25 <400> 15

 Leu Leu Tyr Gly His Thr Val Thr Val
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

35 <400> 16

 Ser Leu Leu Gly Gly Asn Ile Arg Leu
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

45 <400> 17

 Arg Val Ala Ser Pro Thr Ser Gly Val
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 18

Ala Leu Tyr Gly Lys Thr Glu Val Val
 1 5

5 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 19

10 Phe Leu Glu Glu Thr Lys Ala Thr Val
 1 5

15 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

20 Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln Gln Val
 1 5

25 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21

30 Gln Leu Ile Glu Val Ser Ser Pro Ile Thr Leu
 1 5 10

35 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

40 Arg Ile Ala Gly Ile Arg Gly Ile Gln Gly Val
 1 5 10

45 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

50 Arg Leu Tyr Asp Pro Ala Ser Gly Thr Ile Ser Leu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24

Ser Leu Ala Glu Glu Lys Leu Gln Ala Ser Val
1 5 10

5 <210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 25

Tyr Leu Gly Glu Gly Pro Arg Met Val
 1 5

5 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 31

Tyr Gln Met Asp Ile Gln Gln Glu Leu
 1 5

15 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

20 Ala Leu Asn Ala Val Arg Leu Leu Val
 1 5

25 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

30 Leu Leu His Gly His Ile Val Glu Leu
 1 5

35 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

40 Ser Leu Ala Glu Gly Thr Ala Thr Val
 1 5

45 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

50 Ser Leu Gln Glu Ser Ile Leu Ala Gln Val
 1 5 10

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

Ile	Leu	Asn	Val	Asp	Gly	Leu	Ile	Gly	Val
1				5					10

5 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 37

Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro
1				5						10

15 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

20 Ala

Leu	Ala	Asp	Val	Val	His	Glu	Ala
1			5				

25 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 39

30 Ala

Leu	Asp	Pro	Lys	Ala	Asn	Phe	Ser	Thr
1			5					10

35 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Thr	Trp	Val
1				5					10

40 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 41

Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu
1				5						10

50 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

Ala Leu Leu Gly Gly Asn Val Arg Met Met Leu
1 5 10

5 <210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 43

Ala Leu Leu Gly Val Trp Thr Ser Val
1 5

15 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 44
20

Ala Leu Gln Asp Ala Ile Arg Gln Leu

1 5

25 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Ala Leu Gln Asp Gln Leu Val Leu Val
1 5

30 <210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

Ala Met Ala Glu Met Lys Val Val Leu
1 5

40 <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 47

Phe Leu Asp Thr Pro Ile Ala Lys Val
1 5

50 <210> 48

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 48

Phe Leu Leu Glu Gln Pro Glu Ile Gln Val
 1 5 10

10 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 49
 15

Phe Leu Tyr Pro Glu Lys Asp Glu Pro Thr
 1 5 10

20 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

25 Phe Thr Ile Pro Lys Leu Tyr Gln Leu
 1 5

30 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 51

Gly Leu Ala Glu Glu Leu Val Arg Ala
 1 5

35 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 52

Gly Leu Phe Asn Ala Glu Leu Leu Glu Ala
 1 5 10

45 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 53

Gly Leu Ile His Leu Glu Gly Asp Thr Val
 1 5 10

<210> 54

<211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 54

Gly Leu Leu Asp Pro Asn Val Lys Ser Ile Phe Val
 1 5 10

10 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 55

Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu
 1 5

20 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

Gly Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Val
 1 5

25 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

His Leu Thr Glu Ala Ile Gln Tyr Val
 1 5

35 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 58

Ile Leu Ala Asp Leu Asn Leu Ser Val
 1 5

45 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 59

Ile Leu Ala Asp Thr Phe Ile Gly Val
 1 5

5 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

Ile Leu Ser Pro Leu Ser Val Ala Leu
 1 5

10 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 61

Lys Ile Ala Asp Phe Glu Leu Pro Thr Ile
 1 5 10

20 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 62

Lys Ile Ala Gly Thr Asn Ala Glu Val
 1 5

30 <210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 63

Lys Ile Asp Glu Lys Asn Phe Val Val
 1 5

40 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 64

Lys Ile Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Val
 1 5

50 <210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 65

Lys Leu Phe Ser Gly Asp Glu Leu Leu Glu Val
 1 5 10

5 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

Lys Leu His Glu Glu Ile Asp Arg Val
 1 5

10 <210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 67

Lys Leu Lys Glu Thr Ile Gln Lys Leu
 1 5

20 <210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 68

Lys Leu Leu Ala Ala Thr Val Leu Leu Leu
 1 5 10

30 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 69

Lys Leu Leu Asp Glu Val Thr Tyr Leu Glu Ala
 1 5 10

40 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 70

Lys Leu Leu Asp Leu Glu Thr Glu Arg Ile Leu Leu
 1 5 10

50 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 71

Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Asp	Ser	Val
1								
					5			

5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 72

Lys	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Thr	Ser	Val
1								
					5			

15

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 73

Lys	Leu	Thr	Leu	Val	Ile	Ile	Ser	Val
1								
					5			

25

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 74

Lys	Leu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Val
1								
					5			

35

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 75

Lys	Gln	Met	Glu	Pro	Leu	His	Ala	Val
1								
					5			

40

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

45

<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Leu	Leu	Ala	Asp	Ile	Gly	Gly	Asp	Pro	Phe	Ala	Ala
1											
					5				10		

50

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 77

Leu Leu His Glu Glu Asn Phe Ser Val
1 5

5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 78

Leu Leu Ile Asp Asp Glu Tyr Lys Val
1 5

15

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 79

Leu Leu Leu Ser Thr Gly Tyr Glu Ala
1 5

25

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 80

Leu Leu Tyr Glu Gly Lys Leu Thr Leu
1 5

35

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 81

40

Asn Leu Ala Ser Phe Ile Glu Gln Val Ala Val
1 5 10

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 82

Asn Val Phe Asp Gly Leu Val Arg Val
1 5

50

5 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 83

 Gln Leu His Asp Phe Val Met Ser Leu
 1 5

10 <210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 84

 Gln Leu Thr Pro Val Leu Val Ser Val
 1 5

20 <210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 85

 Arg Ile Leu Pro Lys Val Leu Glu Val
 1 5

30 <210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 86

 Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Val
 1 5

40 <210> 87
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 87

 Arg Leu Phe Glu Glu Asn Asp Val Asn Leu
 1 5 10

45

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 88

	Arg	Leu	Ile	Asp	Arg	Ile	Lys	Thr	Val
	1				5				

5 <210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 89

10	Arg	Leu	Ile	Glu	Glu	Ile	Lys	Asn	Val
	1				5				

15 <210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 90

20	Arg	Leu	Leu	Asp	Val	Leu	Ala	Pro	Leu	Val
	1				5				10	

25 <210> 91
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 91

30	Arg	Leu	Pro	Asp	Ile	Pro	Leu	Arg	Gln	Val
	1				5				10	

35 <210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 92

40	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Thr	Leu	Leu	Gln	Gln	Val
	1				5				10		

45 <210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 93

50	Arg	Leu	Tyr	Thr	Met	Asp	Gly	Ile	Thr	Val
	1				5				10	

55 <210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 94

Arg	Met	Ser	Asp	Val	Val	Lys	Gly	Val
1								
						5		

5 <210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 95

Ser	Ile	Cys	Asn	Gly	Val	Pro	Met	Val
1								
						5		

15 <210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 96

20 <210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

Ser	Leu	Leu	Glu	Glu	Pro	Asn	Val	Ile	Arg	Val
1										
					5				10	

25 <210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 97

Ser	Leu	Leu	Pro	Gln	Leu	Ile	Glu	Val
1								
				5				

30 <210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 98

Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Leu	Gln	Tyr	Leu
1										
				5					10	

40 <210> 99
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 99

Ser	Leu	Ser	Ala	Phe	Leu	Pro	Ser	Leu
1								
				5				

50 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 100

Ser Leu Val Gly Asp Ile Gly Asn Val Asn Met
1 5 10

5

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 101

Ser Leu Trp Glu Gly Gly Val Arg Gly Val
1 5 10

15

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 102

Ser Leu Trp Ser Val Ala Arg Gly Val
1 5

25

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 103

Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala
1 5

35

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 104

Ser Val Trp Phe Gly Pro Lys Glu Val
1 5

45

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 105

Ser Val Tyr Asp Gly Lys Leu Leu Ile
1 5

50

5 <210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 106

Thr Leu Ala Ala Ile Ile His Gly Ala
 1 5

10 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 107

Thr Leu Gly Gln Phe Tyr Gln Glu Val

20 1 5
 <210> 108
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 108

Thr Leu Leu Lys Lys Ile Ser Glu Ala
 1 5

30 <210> 109
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 109

Thr Leu Tyr Ala Leu Ser His Ala Val
 1 5

40 <210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 110
 45

Thr Val Gly Gly Ser Glu Ile Leu Phe Glu Val
 1 5 10

50 <210> 111
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 111

	Thr	Val	Met	Asp	Ile	Asp	Thr	Ser	Gly	Thr	Phe	Asn	Val
	1					5						10	

5 <210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 112

10	Val	Leu	Gly	Glu	Val	Lys	Val	Gly	Val
	1				5				

15 <210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 113

20	Val	Leu	Met	Asp	Lys	Leu	Val	Glu	Leu
	1				5				

25 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 114

30	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Tyr	Ser	Lys	Val
	1				5				

35 <210> 115
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 115

40	Val	Val	Leu	Asp	Asp	Lys	Asp	Tyr	Phe	Leu
	1				5				10	

45 <210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 116

50	Trp	Val	Ile	Pro	Ala	Ile	Ser	Ala	Val
	1				5				

55 <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 117

Tyr Ala Phe Pro Lys Ser Ile Thr Val
 1 5

5 <210> 118
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 118

10 Tyr Leu Asp Asp Glu Lys Asn Trp Gly Leu
 1 5 10

15 <210> 119
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 119

20 Tyr Leu Asp Lys Asn Leu Thr Val Ser Val
 1 5 10

25 <210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 120

30 Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala
 1 5

35 <210> 121
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 121

40 Tyr Leu Ile Thr Gly Asn Leu Glu Lys Leu
 1 5 10

45 <210> 122
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 122

50 Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Asp Gly Ala Lys Val Leu
 1 5 10

55 <210> 123
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 123

Tyr Leu Trp Asp Leu Asp His Gly Phe Ala Gly Val
1 5 10

5 <210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 124

Leu Leu Ile Asp Val Val Thr Tyr Leu
1 5

15 <210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 125

Ala Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Val Val
1 5

25 <210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 126

Thr Leu Leu Asp Ser Pro Ile Lys Val
1 5

30 <210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 127

Val Leu Ile Gly Ser Asn His Ser Leu
1 5

40 <210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 128

Gly Leu Ala Phe Ser Leu Asn Gly Val
1 5

50 <210> 129
<211> 9
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 129

Ser Gln Ala Asp Val Ile Pro Ala Val
1 5

5

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 130

Ala Leu Asp Ala Gly Ala Val Tyr Thr Leu
1 5 10

15

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 131

Ala Leu Asp Ser Gly Ala Phe Gln Ser Val
1 5 10

25

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 132

Ala Leu His Glu Glu Val Val Gly Val
1 5

35

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 133

Ala Leu Leu Glu Met Asp Ala Arg Leu
1 5

45

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 134

Ala Leu Leu Glu Thr Asn Pro Tyr Leu Leu
1 5 10

50

5 <210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 135

Ala Leu Leu Gly Lys Ile Glu Lys Val
 1 5

10 <210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 136

Ala Leu Leu Asn Gln His Tyr Gln Val
 1 5

20 <210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 137

Ala Leu Pro Thr Val Leu Val Gly Val
 1 5

30 <210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 138

Ala Leu Ser Gln Val Thr Leu Leu Leu
 1 5

40 <210> 139
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 139

Ala Leu Ser Ser Lys Pro Ala Glu Val
 1 5

45 <210> 140
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 140

ES 2 900 106 T3

Ala Leu Thr Ser Ile Ser Ala Gly Val
 1 5

5 <210> 141
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141

Ala Met Gly Glu Lys Ser Phe Ser Val
 1 5

10 <210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 142

Ala Val Ile Gly Gly Leu Ile Tyr Val
 1 5

20 <210> 143
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 143

Phe Ile Leu Pro Asp Ser Leu Pro Leu Asp Th
 1 5 10

25 <210> 144
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 144

Phe Ile Gln Leu Ile Thr Gly Val
 1 5

30 <210> 145
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 145

Phe Leu Ile Ala Glu Tyr Phe Glu His V
 1 5 10

35 <210> 146
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 146

Phe	Leu	Trp	Thr	Glu	Gln	Ala	His	Thr	Val
1				5					10

5 <210> 147
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 147

Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Val	Val
1				5					10

15 <210> 148
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 148

Gly	Leu	Phe	Ala	Pro	Leu	Val	Phe	Leu
1				5				

25 <210> 149
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 149

Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Ile	Met	Glu	Val
1				5					10	

30 <210> 150
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 150

Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Lys	Ser	Ile
1				5					10

40 <210> 151
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 151

His	Leu	Ala	Lys	Val	Thr	Ala	Glu	Val
1				5				

<210> 152
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5
 <400> 152

Lys Leu Asp Asn Asn Leu Asp Ser Val
 1 5

10 <210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 153

Lys Leu Ile Glu Val Asn Glu Glu Leu
 1 5

20 <210> 154
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 154

Lys Leu Thr Asp His Leu Lys Tyr Val
 1 5

30 <210> 155
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 155

35 Leu Leu Glu Pro Tyr Lys Pro Pro Ser Ala Gln
 1 5 10

<210> 156
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*

<400> 156

Leu Leu Phe Pro His Pro Val Asn Gln Val
 1 5 10

45 <210> 157
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 157

Gln Leu Leu Pro Asn Leu Arg Ala Val
 1 5

5 <210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 158

10 Arg Ile Ile Ser Gly Leu Val Lys Val
 1 5

15 <210> 159
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 159

20 Arg Leu Phe Pro Asp Gly Ile Val Thr Val
 1 5 10

25 <210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 160

30 Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu
 1 5

35 <210> 161
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 161

40 Arg Leu Leu Asp Glu Gln Phe Ala Val
 1 5

45 <210> 162
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 162

50 Arg Leu Met Ser Ala Leu Thr Gln Val
 1 5

55 <210> 163
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 163

1	Arg	Leu	Thr	Glu	Ser	Val	Leu	Tyr	Leu
5									

5 <210> 164
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 164

1	Arg	Met	Leu	Ile	Lys	Leu	Leu	Glu	Val
5									

15 <210> 165
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 165

1	Arg	Val	Ile	Glu	His	Val	Glu	Gln	Val
5									

25 <210> 166
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 166

1	Ser	Ile	Leu	Asp	Ile	Val	Thr	Lys	Val
5									

30 <210> 167
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 167

1	Ser	Leu	Ala	Glu	Ser	Ser	Phe	Asp	Val
5									

40 <210> 168
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 168

1	Ser	Leu	Ala	Val	Leu	Val	Pro	Ile	Val
5									

50 <210> 169
 <211> 9
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 169

Ser Leu Phe Glu Trp Phe His Pro Leu
1 5

5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 170

Ser Leu His Asn Gly Val Ile Gln Leu

1 5

15

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 171

Ser Leu Ile Pro Ala Val Leu Thr Val
1 5

25

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 172

Ser Leu Leu Asn Phe Leu Gln His Leu
1 5

35

<210> 173

<211> 9

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 173

Ser Leu Thr Ser Glu Ile His Phe Leu
1 5

45

<210> 174

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 174

	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Val
	1				5					10

5 <210> 175
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 175

10	Thr	Leu	Phe	Glu	His	Leu	Pro	His	Ile
	1				5				

15 <210> 176
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 176

20	Thr	Leu	Gly	Gln	Ile	Trp	Asp	Val
	1				5			

25 <210> 177
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 177

30	Val	Leu	Asp	Glu	Pro	Tyr	Glu	Lys	Val
	1				5				

35 <210> 178
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 178

40	Tyr	Ile	Phe	Thr	Thr	Pro	Lys	Ser	Val
	1				5				

45 <210> 179
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 179

50	Tyr	Ile	His	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	Val
	1				5				

<210> 180
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 180

Tyr Leu Gly Pro His Ile Ala Ser Val Thr Leu
1 5 10

10 <210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 181

Tyr Leu Leu Glu Lys Phe Val Ala Val
1 5

20 <210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 182

Tyr Leu Leu His Phe Pro Met Ala Leu
1 5

30 <210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 183

Tyr Leu Tyr Asn Asn Glu Glu Gln Val Gly Leu
1 5 10

40 <210> 184

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 184

Val Val Leu Asp Gly Gly Gln Ile Val Thr Val
1 5 10

50 <210> 185

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 185

Ala Leu Phe Pro Ala Leu Arg Pro Gly Gly Phe Gln Ala
1 5 10

60 <210> 186

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 186

Val Leu Leu Ala Gln Ile Ile Gln Val
1 5

5

<210> 187

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 187

Ser Tyr Pro Thr Phe Phe Pro Arg Phe
1 5

15

<210> 188

<211> 10

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 188

Arg Tyr Ser Ala Gly Trp Asp Ala Lys Phe
1 5 10

25

<210> 189

<211> 11

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 189

Ala Phe Ser Pro Asp Ser His Tyr Leu Leu Phe
1 5 10

35

<210> 190

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 190

40

Arg Tyr Asn Glu Lys Cys Phe Lys Leu
1 5

45

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 191

Lys Tyr Pro Asp Ile Ile Ser Arg Ile
1 5

50

<210> 192

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 192

Ser Tyr Ile Thr Lys Pro Glu Lys Trp
 1 5

<210> 193
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 193

Ile Tyr Pro Gly Ala Phe Val Asp Leu
 1 5

<210> 194
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 194

Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu
 25 1 5

<210> 195
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*

<400> 195

Arg Tyr Ala Pro Pro Pro Ser Phe Ser Glu Phe
 1 5 10

<210> 196
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 196

Ala Tyr Leu Lys Trp Ile Ser Gln Ile
 1 5

<210> 197
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 197

Arg Trp Pro Lys Lys Ser Ala Glu Phe
 1 5

5 <210> 198
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 198

Leu	Tyr	Trp	Ser	His	Pro	Arg	Lys	Phe
1								5

10 <210> 199
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 199

Lys	Phe	Val	Thr	Val	Gln	Ala	Thr	Phe
1								5

20 <210> 200
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 200

Ala	Tyr	Leu	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln	Phe
1								5

30 <210> 201
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 201

Ala	Tyr	Val	Asn	Thr	Phe	His	Asn	Ile
1								5

40 <210> 202
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 202

Ala	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Arg	Ser	Asn	Phe
1								5

50 <210> 203
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 203

ES 2 900 106 T3

<400> 209

Val Phe His Pro Arg Gln Glu Leu Ile
1 5

5 <210> 210
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 210

Ala Tyr Pro Ala Ile Arg Tyr Leu Leu
1 5

15 <210> 211
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 211
20

Ile Tyr Ile Pro Ser Tyr Phe Asp Phe
1 5

25 <210> 212
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 212

Val Tyr Gly Asp Val Ile Ser Asn Ile
1 5

30 <210> 213
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 213

Tyr Tyr Asn Lys Val Ser Thr Val Phe
1 5

40 <210> 214
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 214

Ile Tyr Val Thr Ser Ile Glu Gln Ile
1 5

50 <210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 215

Ile Tyr Thr Gly Asn Ile Ser Ser Phe
1 5

10 <210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 216

Ile Tyr Ala Asp Val Gly Glu Glu Phe
1 5

20 <210> 217
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 217

Asp Tyr Ile Pro Tyr Val Phe Lys Leu
1 5

30 <210> 218
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 218

Val Tyr Gln Gly Ala Ile Arg Gln Ile
1 5

40 <210> 219
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 219

Gly Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
1 5 10

50 <210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 220

Ser Leu Leu Glu Lys Glu Leu Glu Ser Val
1 5 10

<210> 221
<211> 10

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 221

5

Ala	Leu	Cys	Glu	Glu	Asn	Met	Arg	Gly	Val
1					5				10

<210> 222

<211> 8

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 222

15

Leu	Thr	Asp	Ile	Thr	Lys	Gly	Val
1				5			

<210> 223

<211> 11

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 223

25

Phe	Leu	Phe	Asn	Thr	Glu	Asn	Lys	Leu	Leu
1				5				10	

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 224

Ala	Leu	Ala	Ser	Val	Ile	Lys	Glu	Leu
1				5				

35

<210> 225

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 225

Lys	Met	Asp	Pro	Val	Ala	Tyr	Arg	Val
1				5				

45

<210> 226

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 226

Ala	Val	Leu	Gly	Pro	Leu	Gly	Leu	Gln	Glu	Val
1				5				10		

<210> 227

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 227

Ala Leu Leu Lys Val Asn Gln Glu Leu
 1 5

10 <210> 228
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 228

Tyr Leu Ile Thr Ser Val Glu Leu Leu
 1 5

20 <210> 229
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 229

Lys Met Phe Glu Ser Phe Ile Glu Ser Val
 1 5 10

25 <210> 230
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 230

Val Leu Thr Glu Phe Thr Arg Glu Val
 1 5

35 <210> 231
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 231

Arg Leu Phe Asn Asp Pro Val Ala Met Val
 1 5 10

45 <210> 232
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 232

Lys Leu Ala Glu Ile Val Lys Gln Val
 1 5

5 <210> 233
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 233

Ala Leu Leu Gly Lys Leu Asp Ala Ile

10 1 5
 <210> 234
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 234

Tyr Leu Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Val
 1 5

20 <210> 235
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 235

Lys Leu Phe Glu Glu Ile Arg Glu Ile
 1 5

30 <210> 236
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 236

Ala Leu Ala Asp Lys Glu Leu Leu Pro Ser Val
 1 5 10

40 <210> 237
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 237

Ala Leu Arg Gly Glu Ile Glu Thr Val
 1 5

<210> 238
 <211> 10

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 238

5

Ala Met Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gly Val
 1 5 10

<210> 239
 <211> 10

10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 239

15 <210> 240
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 240

Phe Leu Leu Gly Phe Ile Pro Ala Lys Ala
 1 5 10

25 <210> 241
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*

<400> 241

Phe Val Leu Pro Leu Leu Gly Leu His Glu Ala
 1 5 10

35 <210> 242
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 242

Gly Leu Phe Ala Pro Val His Lys Val
 1 5

45 <210> 243
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 243

50

Gly Leu Leu Asp Asn Pro Glu Leu Arg Val
 1 5 10

<210> 244

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 244

Lys Ile Ala Glu Leu Leu Glu Asn Val
 1 5

10 <210> 245
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 245
 15

Lys Leu Gly Ala Val Phe Asn Gln Val
 1 5

20 <210> 246
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 246

25 Lys Leu Ile Ser Ser Tyr Tyr Asn Val
 1 5

30 <210> 247
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 247

Lys Leu Leu Asp Thr Met Val Asp Thr Phe Leu
 1 5 10

35 <210> 248
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 248

Lys Leu Asn Asp Leu Ile Gln Arg Leu
 1 5

45 <210> 249
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 249

Leu Leu Leu Gly Glu Arg Val Ala Leu
 1 5

5 <210> 250
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 250

Asn Leu Ala Glu Val Val Glu Arg Val
 1 5

10 <210> 251
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 251

Arg Leu Phe Ala Asp Ile Leu Asn Asp Val
 1 5 10

20 <210> 252
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 252

Arg Thr Ile Glu Tyr Leu Glu Glu Val
 1 5

30 <210> 253
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 253

Arg Val Pro Pro Pro Pro Gln Ser Val
 1 5

40 <210> 254
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 254

Arg Val Gln Glu Ala Ile Ala Glu Val
 1 5

50 <210> 255
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 255

	Ser	Leu	Phe	Gly	Gln	Asp	Val	Lys	Ala	Val
	1				5					10

5 <210> 256
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 256

10	Ser	Leu	Phe	Gln	Gly	Val	Glu	Phe	His	Tyr	Val
	1				5					10	

15 <210> 257
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 257

20	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Pro	Glu	Leu
	1				5					10

25 <210> 258
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 258

30	Ser	Leu	Met	Gly	Pro	Val	Val	His	Glu	Val
	1				5					10

35 <210> 259
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 259

40	Thr	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Met	Arg	Ser	Val
	1				5					10

45 <210> 260
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 260

50	Thr	Leu	Met	Asp	Met	Arg	Leu	Ser	Gln	Val
	1				5					10

55 <210> 261
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 261

ES 2 900 106 T3

	Val	Leu	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Trp	His	Val
	1				5					10

5 <210> 262
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10	<400> 262
----	-----------

	Val	Leu	Pro	Asn	Phe	Leu	Pro	Tyr	Asn	Val
	1				5					10

15 <210> 263
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20	<400> 263
----	-----------

	Val	Leu	Tyr	Pro	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile
	1				5				

25 <210> 264
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30	<400> 264
----	-----------

	Val	Met	Gln	Asp	Pro	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Val
	1				5						10

35 <210> 265
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40	<400> 265
----	-----------

	Trp	Leu	Ile	Glu	Asp	Gly	Lys	Val	Val	Thr	Val
	1				5					10	

45 <210> 266
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50	<400> 266
----	-----------

	Ser	Leu	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu
	1				5						10

55 <210> 267
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60	<400> 267
----	-----------

	Ala	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Asn	Gln	Val
	1					5			

5 <210> 268
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10	<400> 268
----	-----------

10	Lys	Leu	Tyr	Gln	Glu	Val	Glu	Ile	Ala	Ser	Val
	1					5					10

15 <210> 269
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15	<400> 269
----	-----------

20	Tyr	Leu	Met	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asn	Lys	Val
	1					5				10

20 <210> 270
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25	<400> 270
----	-----------

25	Ser	Val	Leu	Asp	Gln	Lys	Ile	Leu	Leu
	1					5			

30 <210> 271
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35	<400> 271
----	-----------

35	Leu	Leu	Leu	Asp	Lys	Leu	Ile	Leu	Leu
	1					5			

40 <210> 272
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45	<400> 272
----	-----------

45	Gln	Gln	Leu	Asp	Ser	Lys	Phe	Leu	Glu	Gln	Val
	1				5						10

50 <210> 273
 <211> 10
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 273

Ala Ile Leu Glu Thr Ala Pro Lys Glu Val
1 5 10

5

<210> 274

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 274

Ala Leu Ala Glu Ala Leu Lys Glu Val
1 5

15

<210> 275

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 275

Ala Leu Ile Glu Gly Ala Gly Ile Leu Leu
1 5 10

25

<210> 276

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 276

Ala Leu Leu Glu Ala Asp Val Asn Ile Lys Leu
1 5 10

35

<210> 277

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 277

40

Ala Leu Leu Glu Glu Asn Ser Thr Pro Gln Leu
1 5 10

45

<210> 278

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 278

Ala Leu Thr Ser Val Val Val Thr Leu
1 5

50

<210> 279

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 279

Ala Leu Trp Thr Gly Met His Thr Ile
 1 5

10 <210> 280
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 280
 15

Ala Thr Leu Asn Ile Ile His Ser Val
 1 5

20 <210> 281
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 281

25 Gly Leu Leu Ala Gly Asp Arg Leu Val Glu Val
 1 5 10
 25

30 <210> 282
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 282

Gly Gln Phe Pro Ser Tyr Leu Glu Thr Val
 1 5 10

35 <210> 283
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 283

Ile Leu Ser Gly Ile Gly Val Ser Gln Val
 1 5 10

45 <210> 284
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 284

Lys Leu Asp Ala Phe Val Glu Gly Val
 1 5

5 <210> 285
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 285

Lys	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp	Ser	Thr	Ser	Val
1					5					10

10 <210> 286
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 286

Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Val	Phe	Arg	Ala
1					5			

20 <210> 287
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 287

Leu	Ile	Gly	Glu	Phe	Leu	Glu	Lys	Val
1					5			

30 <210> 288
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 288
 35

Leu	Leu	Asp	Asp	Ser	Leu	Val	Ser	Ile
1					5			

40 <210> 289
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 289

Leu	Leu	Leu	Glu	Glu	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Val
1				5					10	

45 <210> 290
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 290

	Asn	Leu	Ile	Asp	Leu	Asp	Asp	Leu	Tyr	Val
	1				5					10

5 <210> 291
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 291

10	Gln	Leu	Ile	Asp	Tyr	Glu	Arg	Gln	Leu
	1				5				

15 <210> 292
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 292

20	Arg	Ile	Pro	Ala	Tyr	Phe	Val	Thr	Val
	1				5				

25 <210> 293
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 293

30	Phe	Leu	Ala	Ser	Glu	Ser	Leu	Ile	Lys	Gln	Ile
	1				5					10	

35 <210> 294
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 294

40	Arg	Leu	Ile	Asp	Leu	His	Thr	Asn	Val
	1				5				

45 <210> 295
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 295

50	Ser	Leu	Phe	Ser	Ser	Pro	Pro	Glu	Ile
	1				5				

55 <210> 296
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 296

Ser Leu Leu Ser Gly Arg Ile Ser Thr Leu

1 5 10

5 <210> 297

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 297

10 Thr Leu Phe Tyr Ser Leu Arg Glu Val
1 5

15 <210> 298

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 298

20 Thr Met Ala Lys Glu Ser Ser Ile Ile Gly Val
1 5 10

25 <210> 299

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 299

30 Ala Leu Leu Arg Val Thr Pro Phe Ile
1 5

35 <210> 300

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 300

40 Thr Leu Ala Gln Gln Pro Thr Ala Val
1 5

45 <210> 301

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 301

45 Val Leu Ala Asp Phe Gly Ala Arg Val
1 5

<210> 302

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 302

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
 1 5

10 <210> 303
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 303

Gly Val Tyr Asp Gly Glu Glu His Ser Val
 1 5 10

20 <210> 304
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 304

Ser Leu Ile Asp Gln Phe Phe Gly Val
 1 5

25 <210> 305
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 305

Gly Val Leu Glu Asn Ile Phe Gly Val
 1 5

35 <210> 306
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 306

Lys Leu Val Glu Phe Asp Phe Leu Gly Ala
 1 5 10

45 <210> 307
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 307

Ala Val Val Glu Phe Leu Thr Ser Val
 1 5

5 <210> 308
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 308

Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val
 1 5

10 <210> 309
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 309

Gly Leu Ile Glu Ile Ile Ser Asn Ala
 1 5

20 <210> 310
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 310

Ser Leu Trp Gly Gly Asp Val Val Leu
 1 5

30 <210> 311
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 311

Phe Leu Ile Pro Ile Tyr His Gln Val
 1 5

40 <210> 312
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 312

Arg Leu Gly Ile Lys Pro Glu Ser Val
 1 5

<210> 313

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 313

Leu Thr Ala Pro Pro Glu Ala Leu Leu Met Val
 1 5 10

10 <210> 314
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 314

Tyr Leu Ala Pro Phe Leu Arg Asn Val
 1 5

20 <210> 315
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 315

25 Lys Val Leu Asp Gly Ser Pro Ile Glu Val
 1 5 10

30 <210> 316
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 316

Leu Leu Arg Glu Lys Val Glu Phe Leu
 1 5

35 <210> 317
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 317

Lys Leu Pro Glu Lys Trp Glu Ser Val
 1 5

45 <210> 318
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 318

Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys Ile
 1 5

5 <210> 319
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 319

10 Lys Leu Phe Asn Glu Phe Ile Gln Leu
 1 5

15 <210> 320
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 320

Gly Leu Ala Asp Asn Thr Val Ile Ala Lys Val
 1 5 10

20 <210> 321
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 321

Gly Val Ile Ala Glu Ile Leu Arg Gly Val
 1 5 10

30 <210> 322
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 322

Ile Leu Tyr Asp Ile Pro Asp Ile Arg Leu
 1 5 10

40 <210> 323
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 323

Lys Ile Ile Asp Glu Asp Gly Leu Leu Asn Leu
 1 5 10

50 <210> 324
 <211> 10
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 324

Arg Leu Phe Glu Thr Lys Ile Thr Gln Val
1 5 10

5

<210> 325

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 325

Arg Leu Ser Glu Ala Ile Val Thr Val
1 5

15

<210> 326

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 326

Ala Leu Ser Asp Gly Val His Lys Ile
1 5

25

<210> 327

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 327

Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val
1 5

35

<210> 328

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 328

40

Arg Leu Glu Glu Asp Asp Gly Asp Val Ala Met
1 5 10

<210> 329

<211> 9

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 329

Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu
1 5

50

<210> 330
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5
 <400> 330

Ser Met Ser Ala Asp Val Pro Leu Val
 1 5

10 <210> 331
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 331

Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu
 1 5 10

20 <210> 332
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 332

Ala Met Leu Ala Val Leu His Thr Val
 1 5

30 <210> 333
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 333

Gly Leu Ala Glu Asp Ile Asp Lys Gly Glu Val
 1 5 10

35 <210> 334
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 334

Ser Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val
 1 5 10

45 <210> 335
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 335

Ser Leu Leu Pro Val Asp Ile Arg Gln Tyr Leu
 1 5 10

5 <210> 336
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 336

10 Tyr Leu Pro Thr Phe Phe Leu Thr Val
 1 5

15 <210> 337
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 337

20 Thr Leu Leu Ala Ala Glu Phe Leu Lys Gln Val
 1 5 10

25 <210> 338
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 338

30 Lys Leu Phe Asp Ser Asp Pro Ile Thr Val Thr Val
 1 5 10

35 <210> 339
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 339

40 Arg Leu Ile Ser Lys Phe Asp Thr Val
 1 5

45 <210> 340
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 340

50 Lys Val Phe Asp Glu Val Ile Glu Val
 1 5

55 <210> 341
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 341

Tyr	Leu	Ala	Ile	Gly	Ile	His	Glu	Leu
1								5

5 <210> 342
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 342

Ala	Met	Ser	Ser	Lys	Phe	Phe	Leu	Val
1								5

15 <210> 343
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 343

Leu	Leu	Leu	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Val
1								5

25 <210> 344
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 344

Val	Tyr	Ile	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu
1								5

30 <210> 345
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 345

Ser	Tyr	Asn	Pro	Leu	Trp	Leu	Arg	Ile
1								5

40 <210> 346
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 346

Leu	Tyr	Gln	Ile	Leu	Gln	Gly	Ile	Val	Phe
1								5	10

50 <210> 347
 <211> 9
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 347

Ala Leu Asn Pro Ala Asp Ile Thr Val
1 5

5

<210> 348

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 348

Ala Tyr Lys Pro Gly Ala Leu Thr Phe
1 5

15

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 47 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en que dicho péptido tiene una longitud total de hasta 30 aminoácidos y tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.
- 5 2. El péptido o una variante del mismo acorde con la reivindicación 1, en que dicho péptido tiene una longitud total de hasta 16 aminoácidos, y preferentemente en que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 47.
- 10 3. El péptido acorde con la reivindicación 1 o 2, en que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos, y/o en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR.
- 15 4. Anticuerpo, soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, preferiblemente el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que está unido a una molécula del MHC.
- 20 5. Receptor de linfocito T (TCR), soluble o unido a membrana, que es reactivo con un ligando HLA, y dicho ligando tiene una identidad de al menos el 88% con, y preferentemente consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 47, en que opcionalmente dicho TCR se proporciona como una molécula soluble y también opcionalmente es portador de una función efectora adicional, como un dominio inmunoestimulador o una toxina.
- 25 6. Ácido nucleico, que codifica un péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo acorde con la reivindicación 4, el TCR acorde con la reivindicación 5, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.
- 30 7. Célula hospedadora que comprende el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, en que dicha célula hospedadora preferiblemente es una célula presentadora de antígeno como una célula dendrítica, o un linfocito T o una célula NK.
- 35 8. Método para producir el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo acorde con la reivindicación 4, o el TCR acorde con la reivindicación 5, el método que comprende el cultivo de una célula hospedadora acorde con la reivindicación 7 que presenta el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o expresa el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, y el aislamiento de dicho péptido, dicho anticuerpo o dicho TCR a partir de la célula hospedadora y/o de su medio de cultivo.
- 40 9. Método *in vitro* para producir linfocitos T activados, método que comprende la puesta en contacto de linfocitos T *in vitro* con antígeno cargado en moléculas MHC de clase I humanas que se expresan en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o en un constructo artificial que emula a una célula presentadora de antígeno durante un período de tiempo suficiente para activar dichos linfocitos T de un modo específico de antígeno, siendo dicho antígeno un péptido acorde con la reivindicación 1 o 2.
- 45 10. Linfocito T activado, producido con el método acorde con la reivindicación 9, que reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada en la reivindicación 1 o 2.
- 50 11. Composición farmacéutica que comprende al menos un ingrediente activo seleccionado del grupo consistente en el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo acorde con la reivindicación 4, el TCR acorde con la reivindicación 5, el ácido nucleico o el vector de expresión acordes con la reivindicación 6, la célula hospedadora que comprende el vector de expresión acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.
- 55 12. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo acorde con la reivindicación 4, el TCR acorde con la reivindicación 5, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, la célula hospedadora que comprende el vector de expresión acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica acorde con la reivindicación 11 para el uso en medicina.
- 60 13. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo acorde con la reivindicación 4, el TCR acorde con la reivindicación 5, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, la célula hospedadora que comprende el vector de expresión acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica acorde con la reivindicación 11 para el uso en el tratamiento del cáncer.
- 65 14. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el anticuerpo acorde con la reivindicación 4, el TCR acorde con la reivindicación 5, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, la célula

hospedadora que comprende el vector de expresión acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica acorde con la reivindicación 11 para el uso acorde con la reivindicación 13, en que dicho cáncer es seleccionado entre el grupo consistente en CHC, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de colon o recto o leucemia y otros tumores que muestren una sobreexpresión de NKD1.

5

15. Un equipo que comprende:

- 10 (a) un envase que comprende una composición farmacéutica acorde con la reivindicación 11, en forma de solución o de liofilizado;
(b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada;
(c) opcionalmente, instrucciones de (I) uso de la solución o (II) de la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada, y, opcionalmente,
15 (d) además puede comprender uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (VII) una jeringa.

Figura 1A

Péptido: ALVDTLKFKV (A*02)

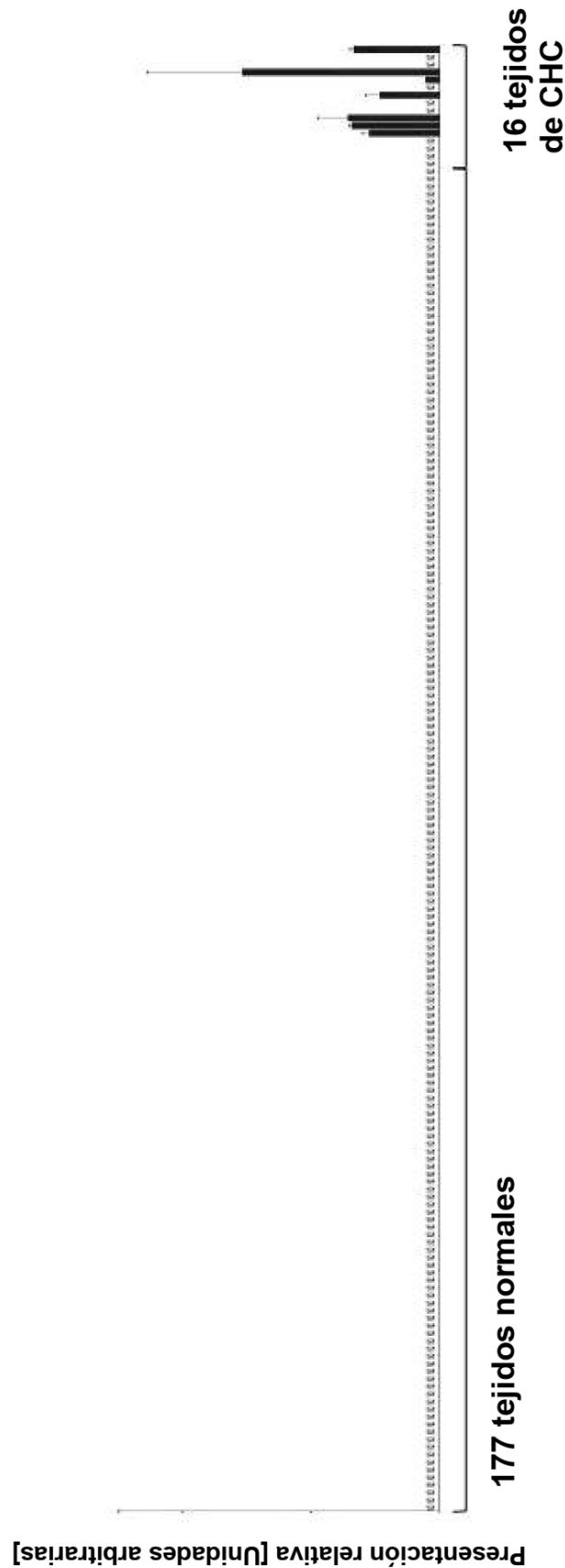


Figura 1B
Péptido: KLQAGTVFV (A*02)

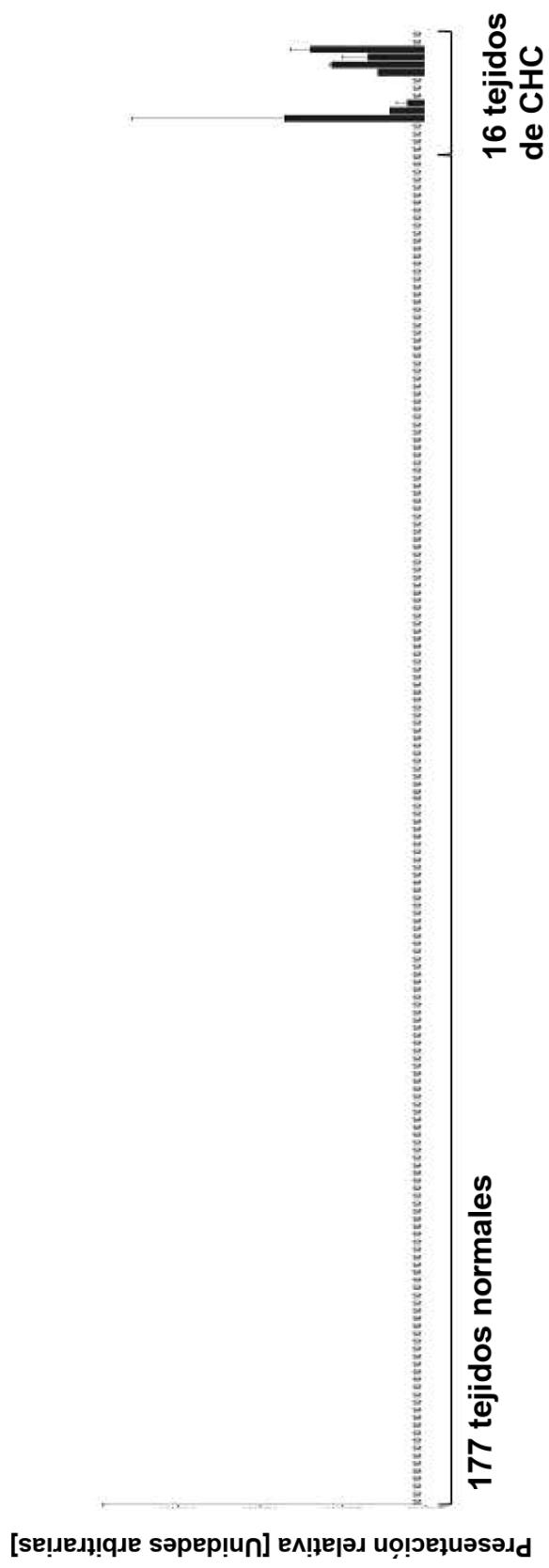


Figura 1C

Péptido: AYLLQPSQF (A^{*}24)

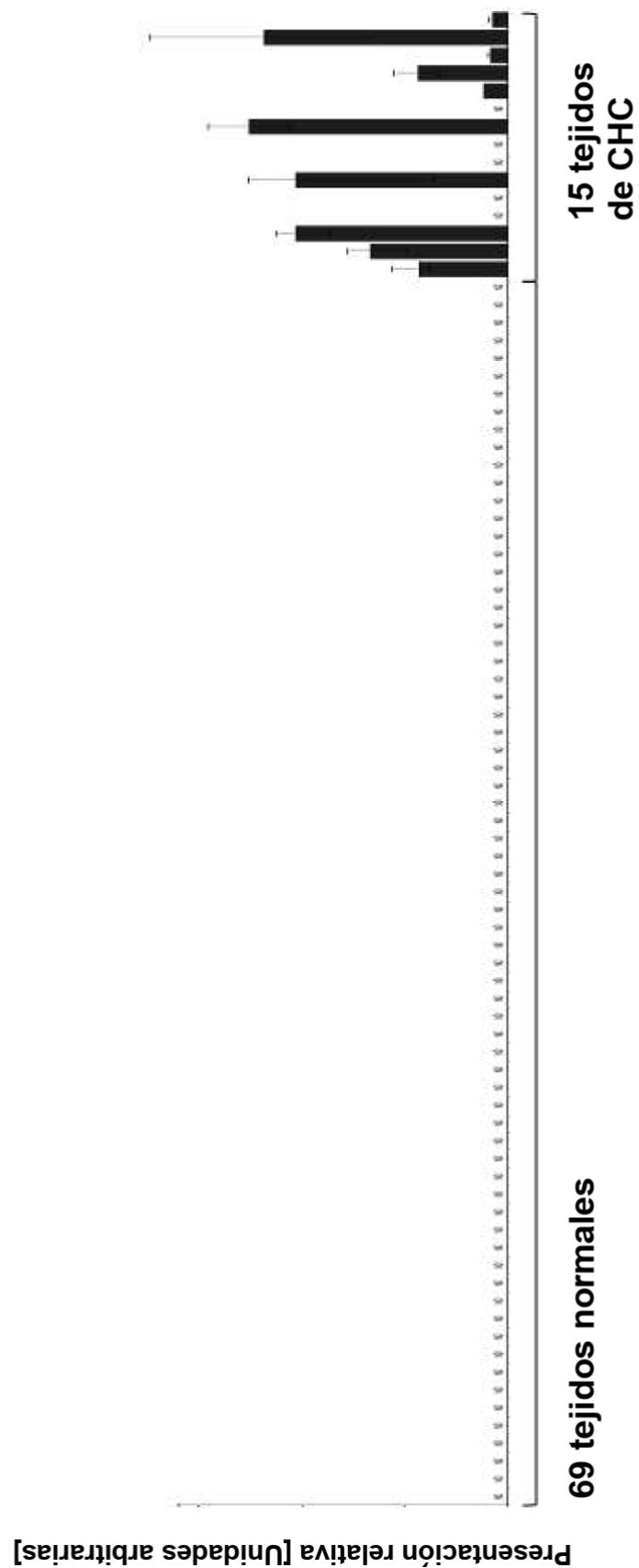


Figura 1D

Péptido: KIDEKNFVV (A*02)

Seq ID: 63

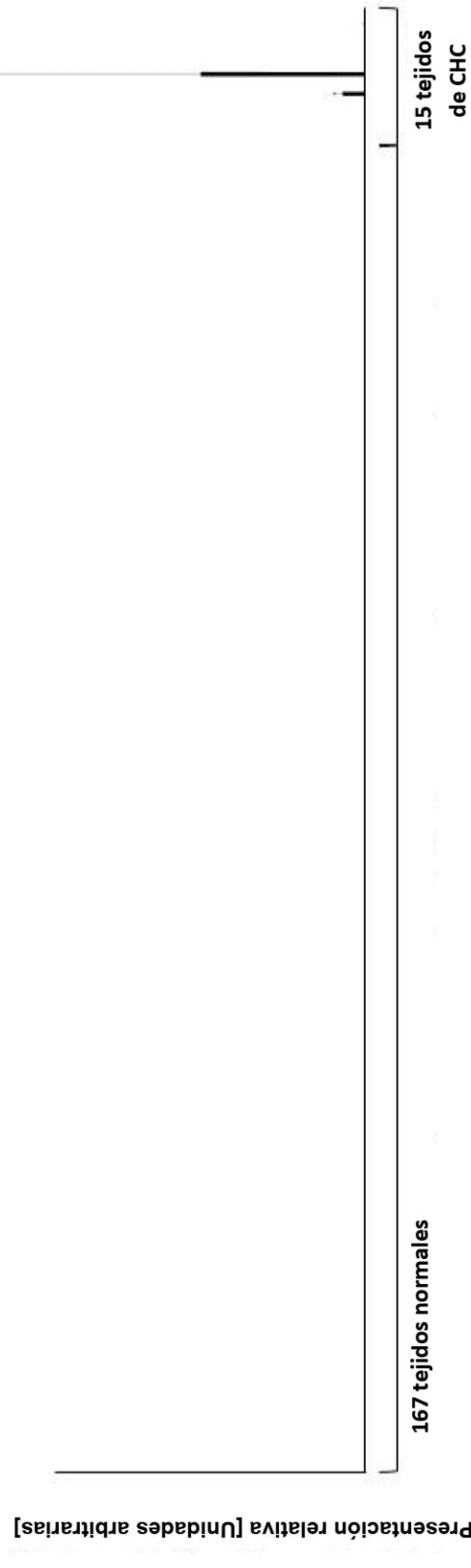


Figura 1E

Péptido: KIDEKNFVV (A*02)
SEQ ID: 63

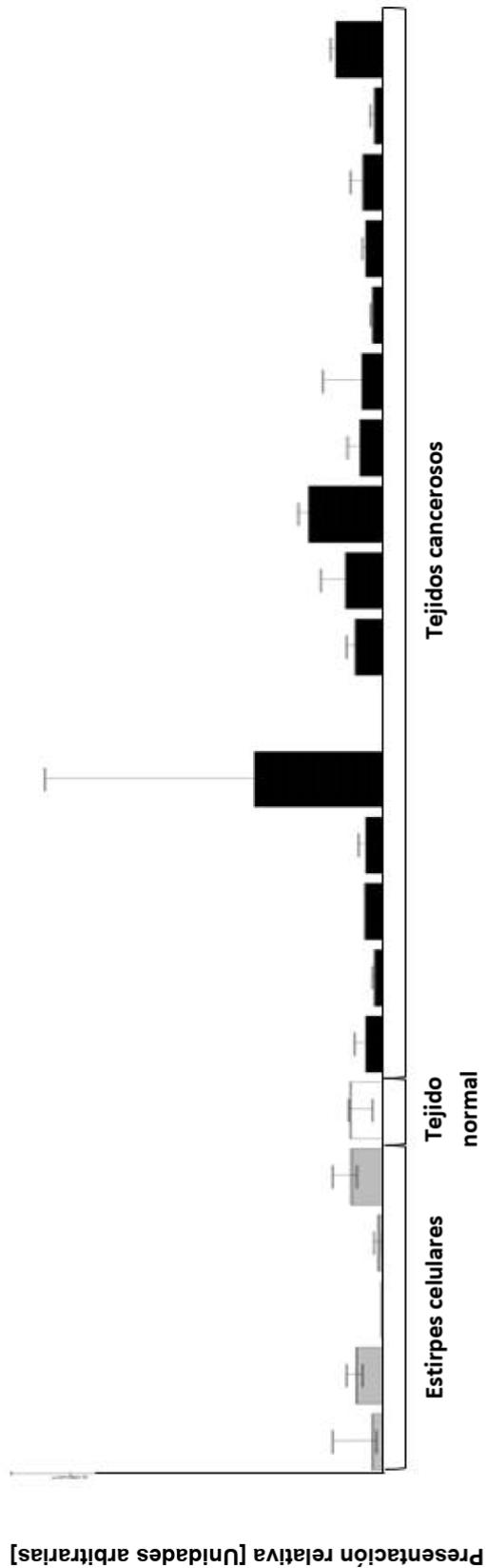


Figura 1F

Péptido: RLPPDTLLQQV (A*02)
Seq ID: 92

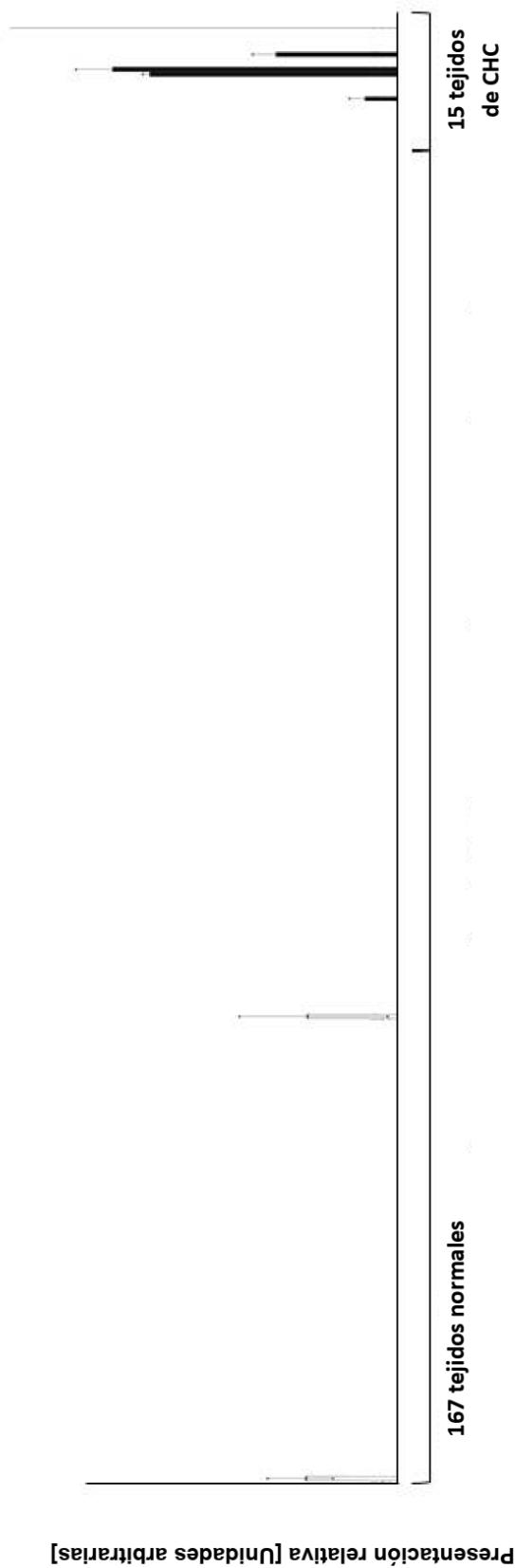


Figura 1G

Péptido: RLPPDTLLQQV (A*02)
SEQ ID: 92

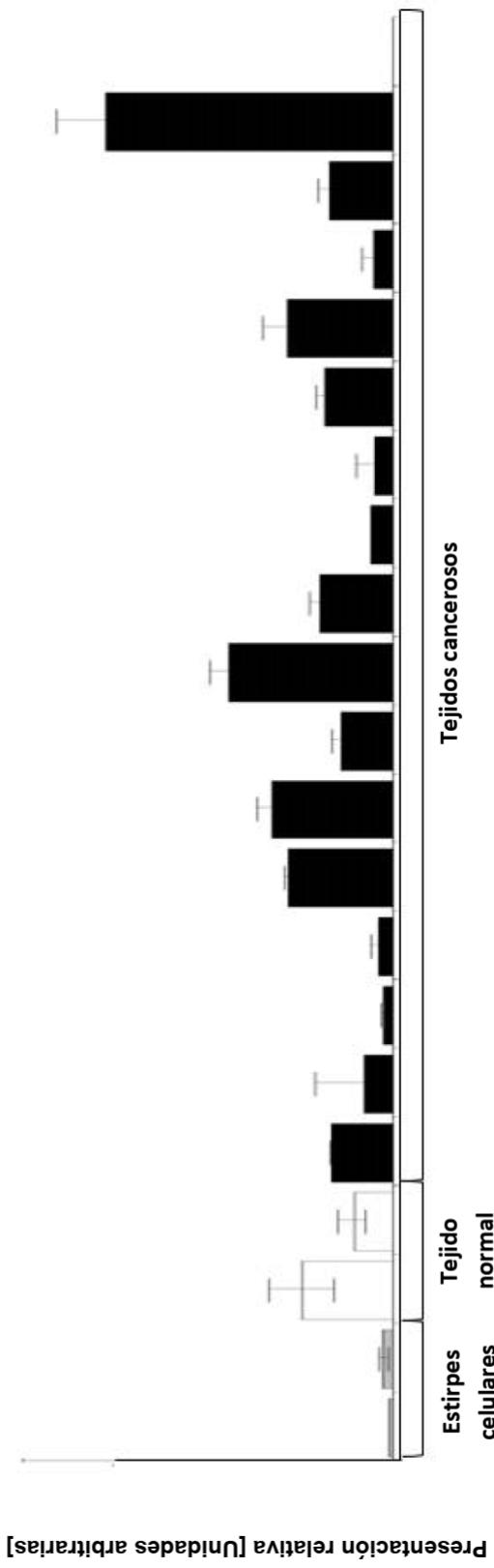


Figura 1H

Péptido: SVWFGPKEV (A*02)
Seq ID: 104

Presentación relativa [Unidades arbitrarias]

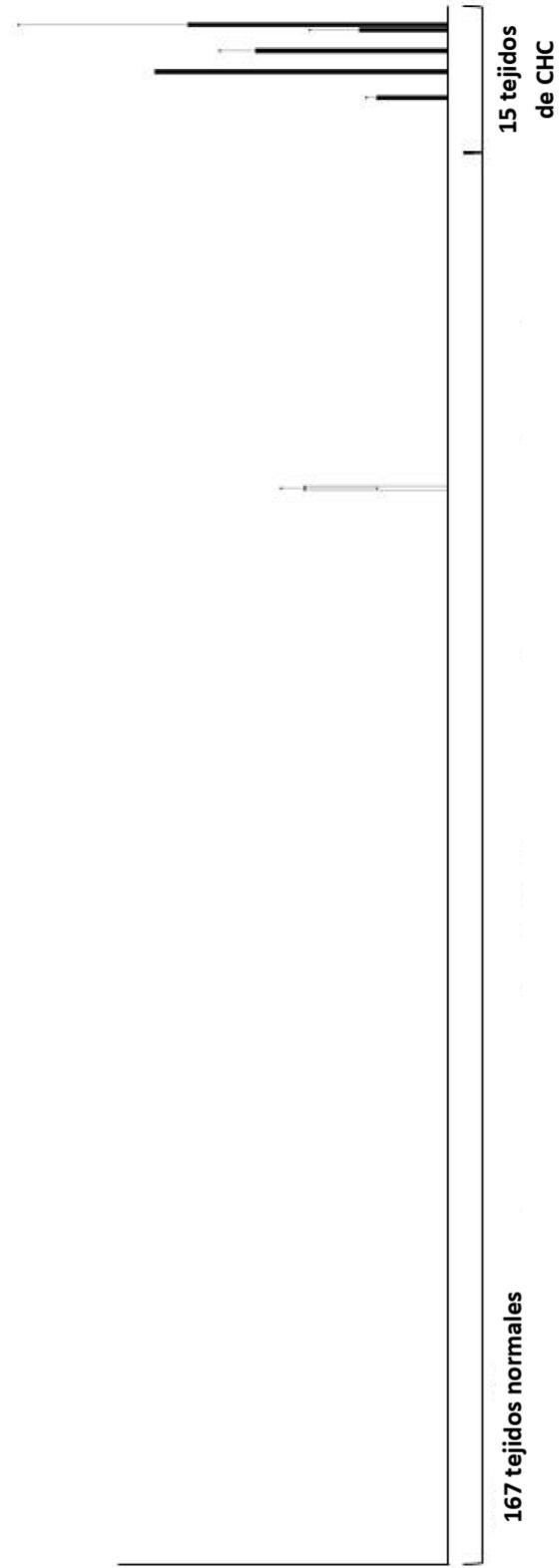


Figura 11

Péptido: SVWFGPKEV (A*02)
SEQ ID: 104

Presentación relativa [Unidades arbitrarias]

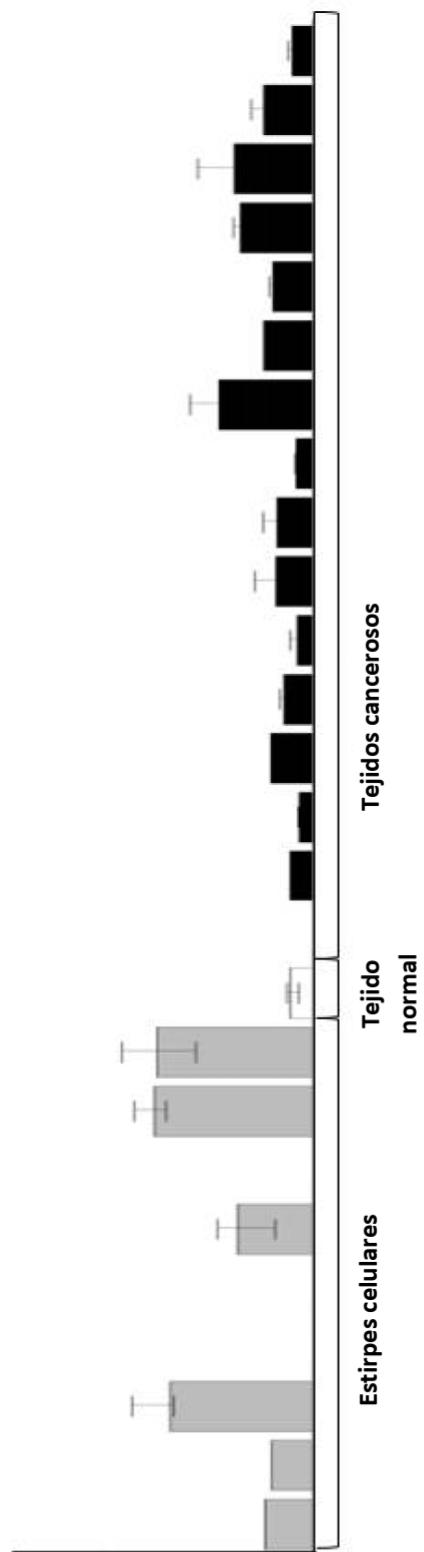


Figura 1J

Péptido: LLFPHPVNQV (A*02)
Seq ID: 156

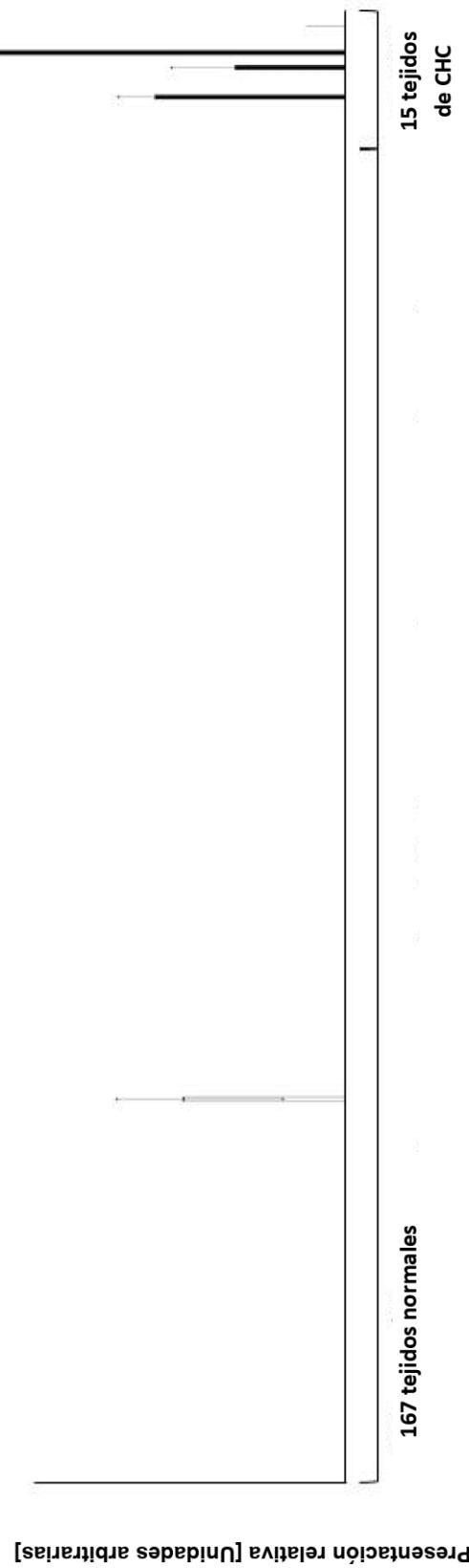


Figura 1K

Péptido: LLFPHPVNQV (A*02)
SEQ ID: 156

Presentación relativa [Unidades arbitrarias]

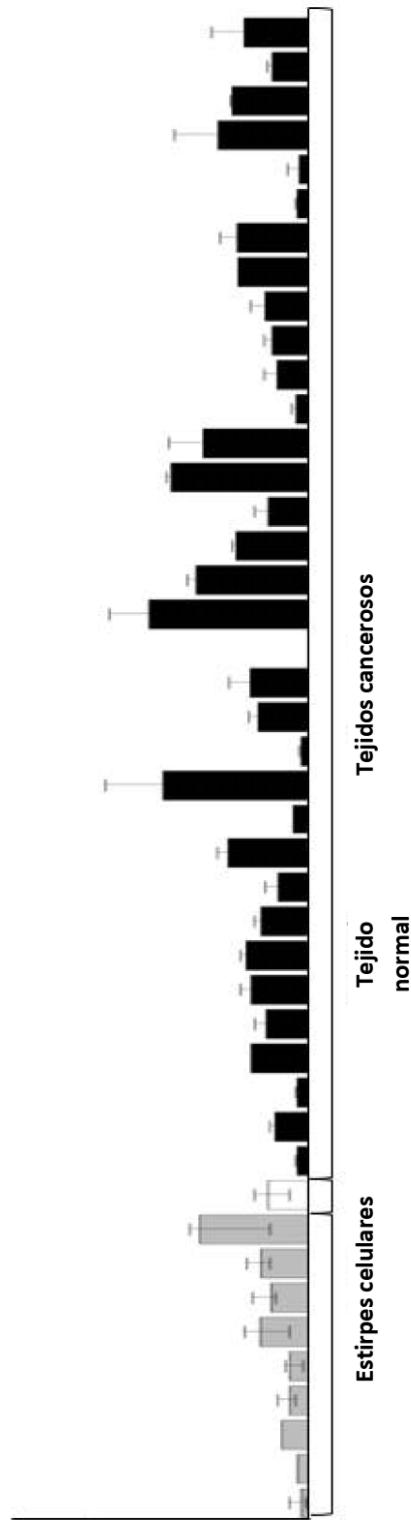


Figura 1L

Péptido: FLDTPIAKV (A*02)
Seq ID: 47

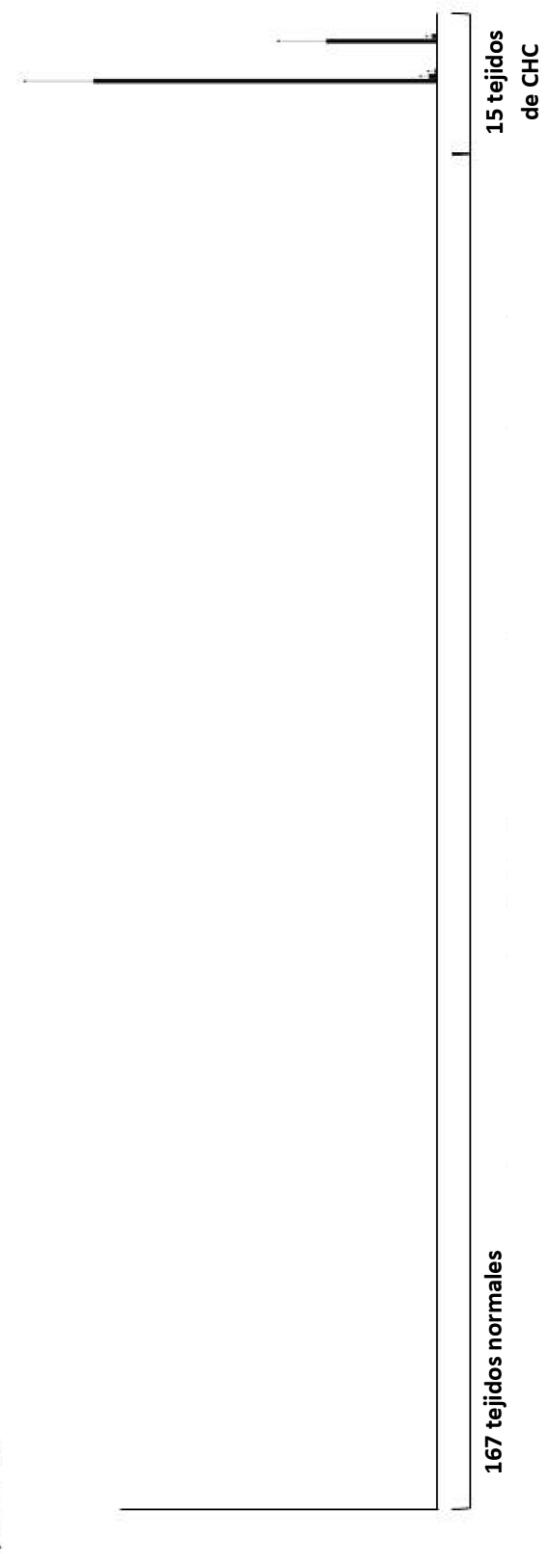
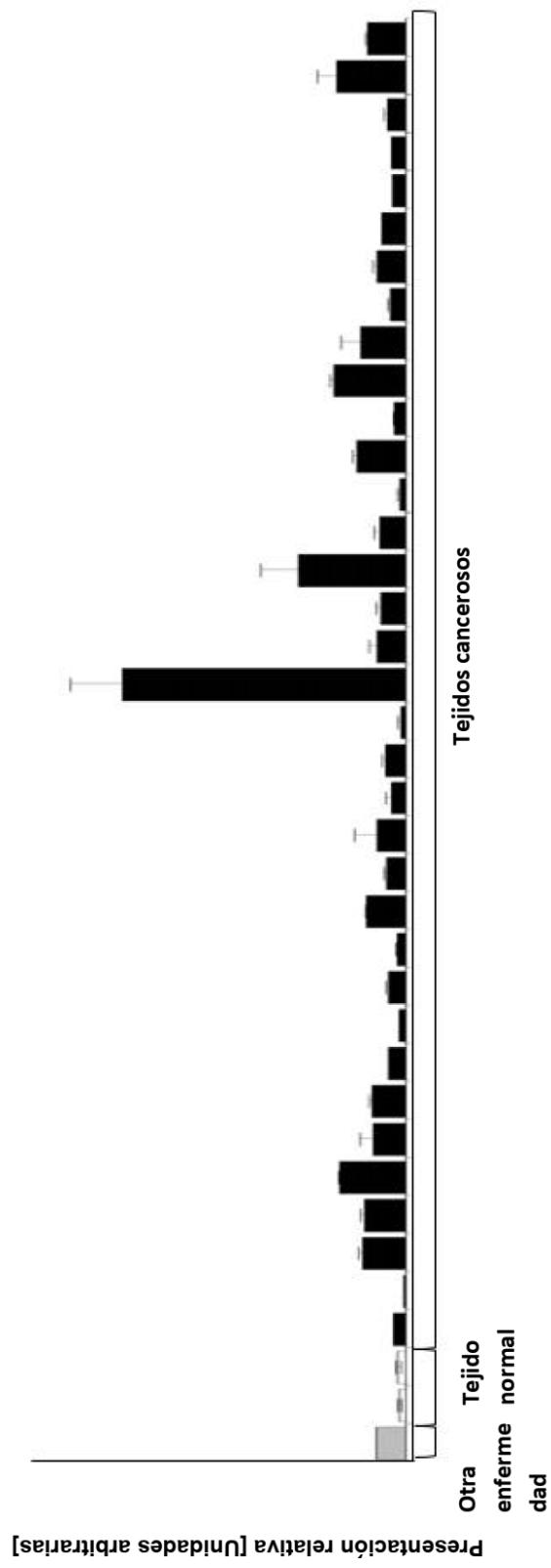


Figura 1M

Péptido: FLDTPIAKV (A*02)
SEQ ID: 47



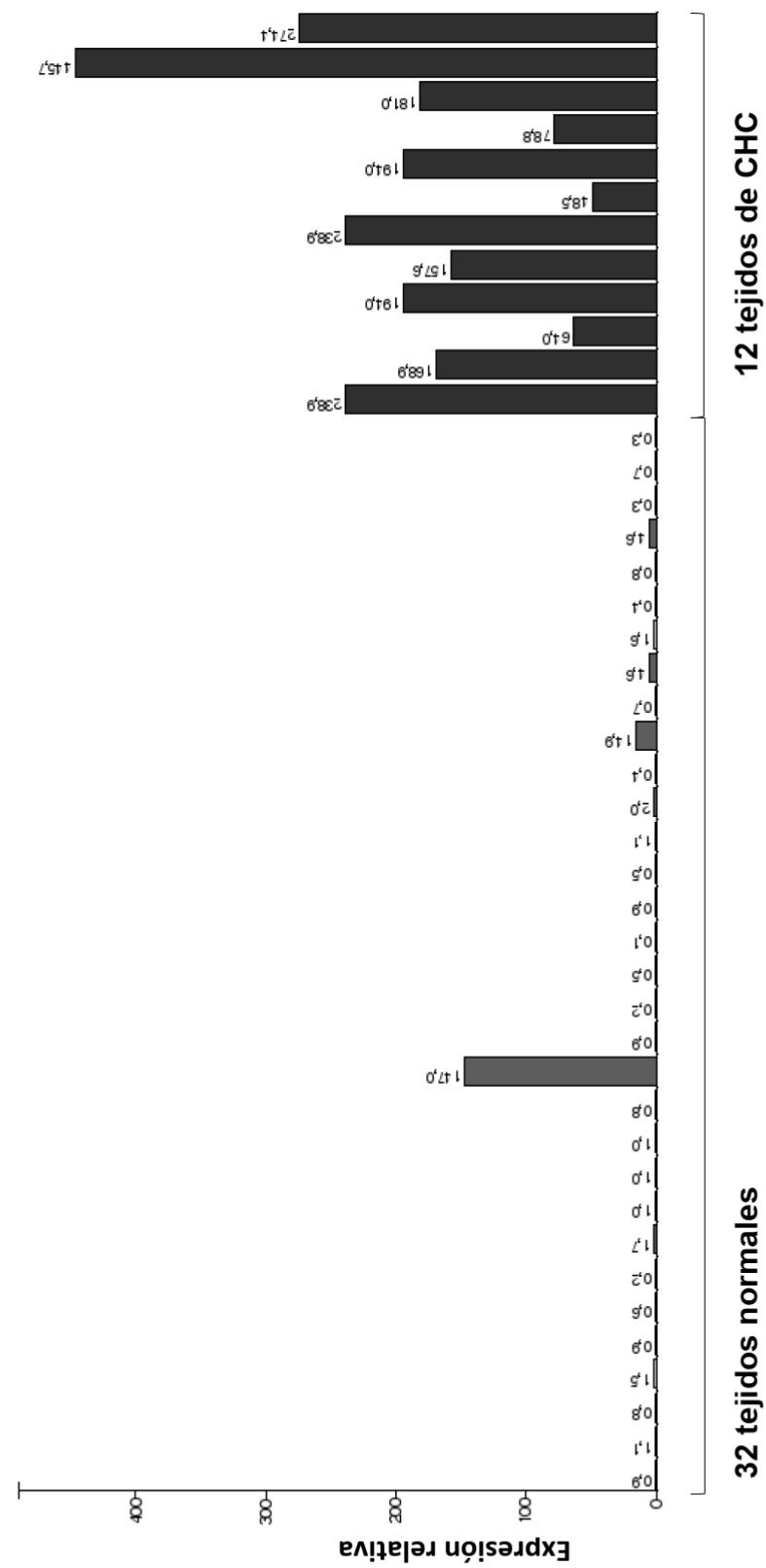


Figura 2A

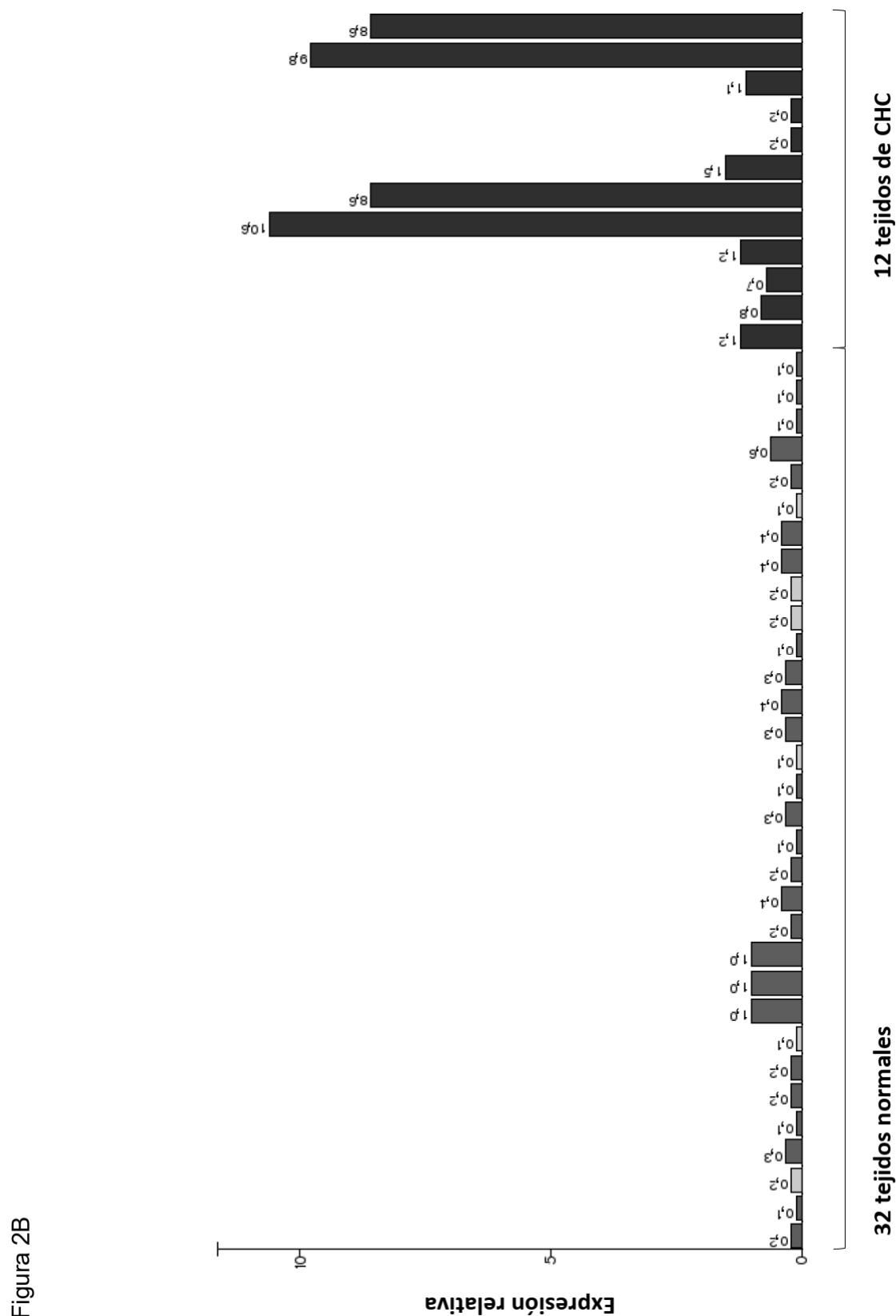
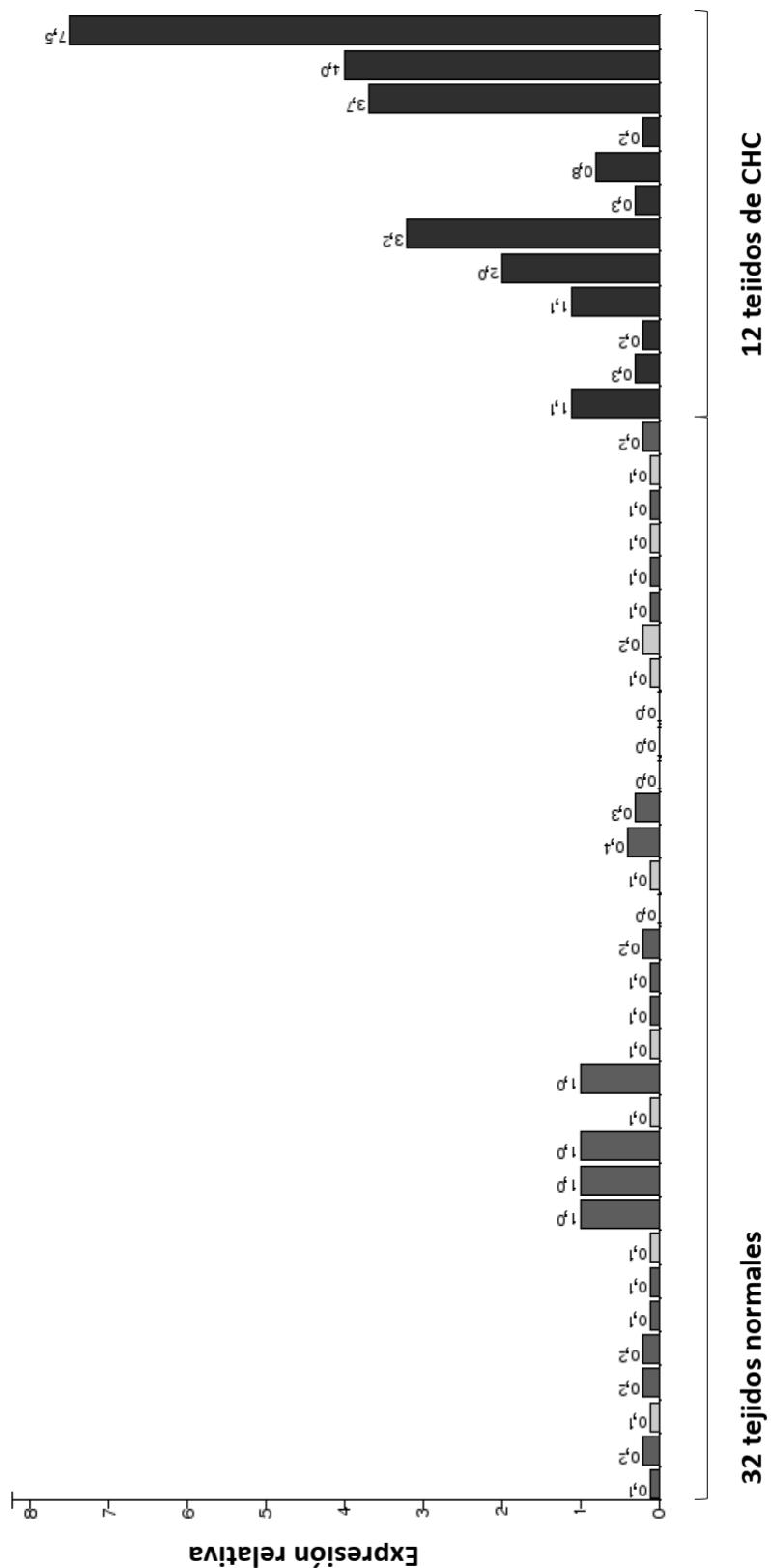


Figura 2C



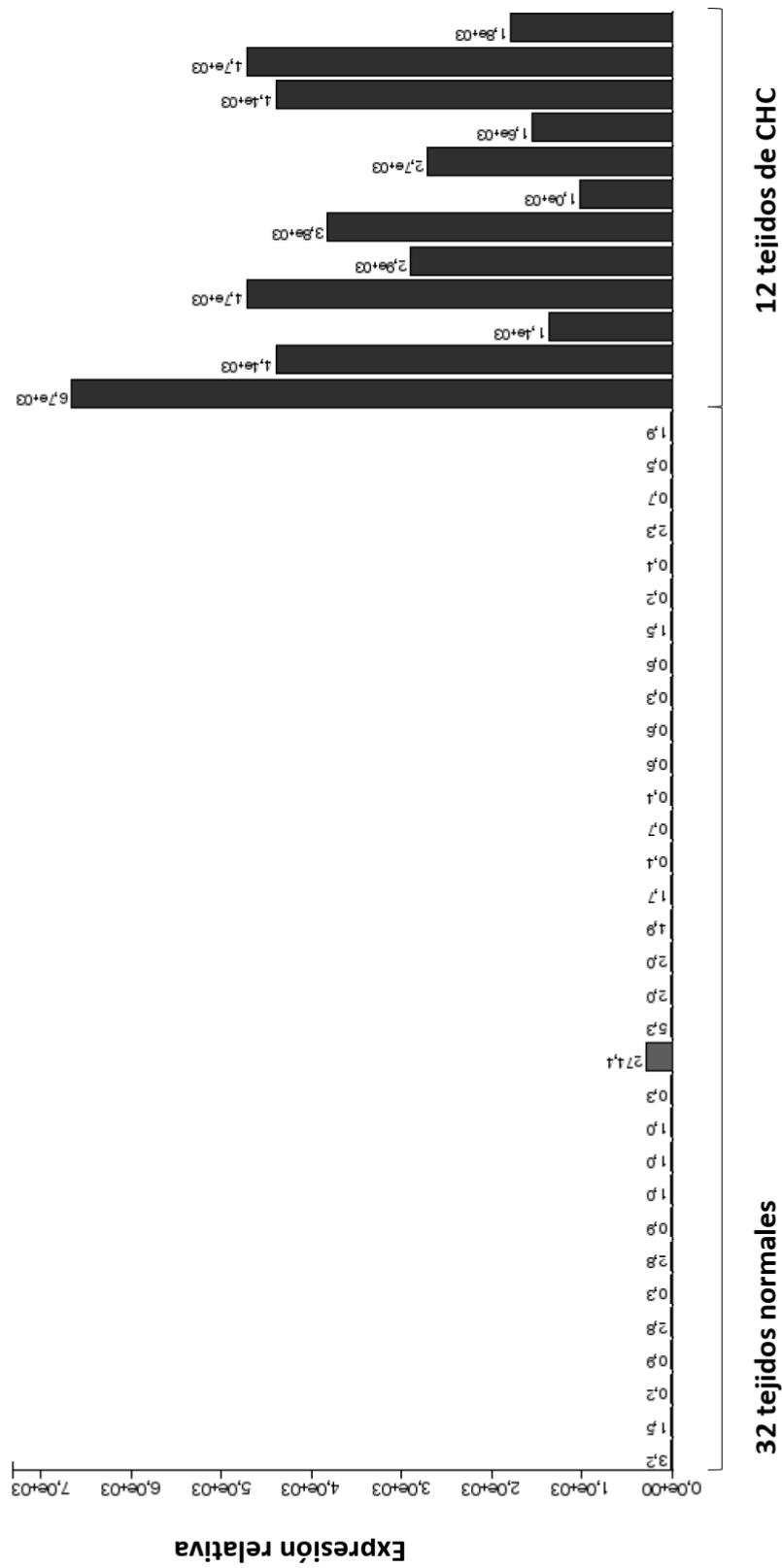


Figura 2D

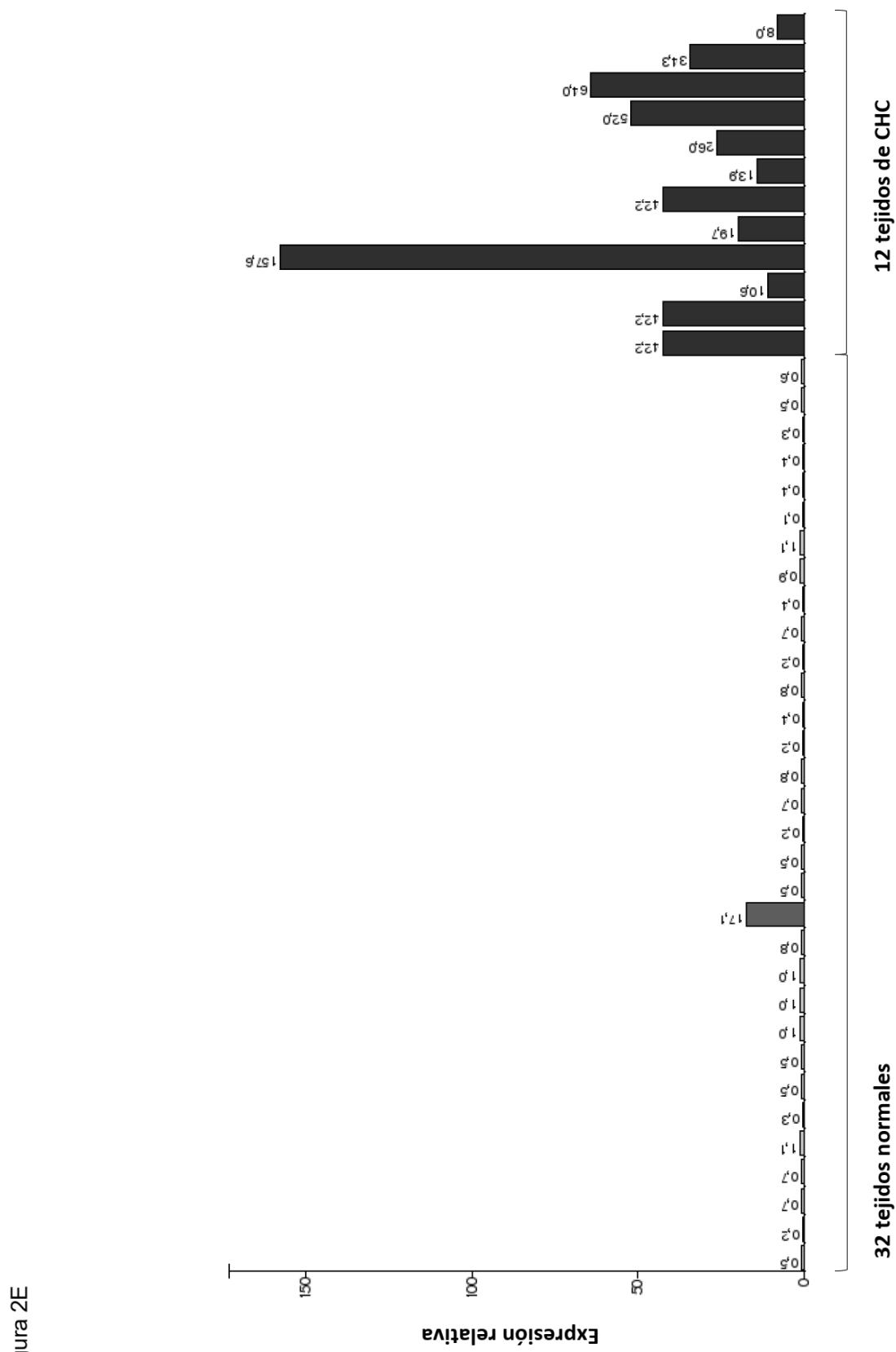


Figura 2E

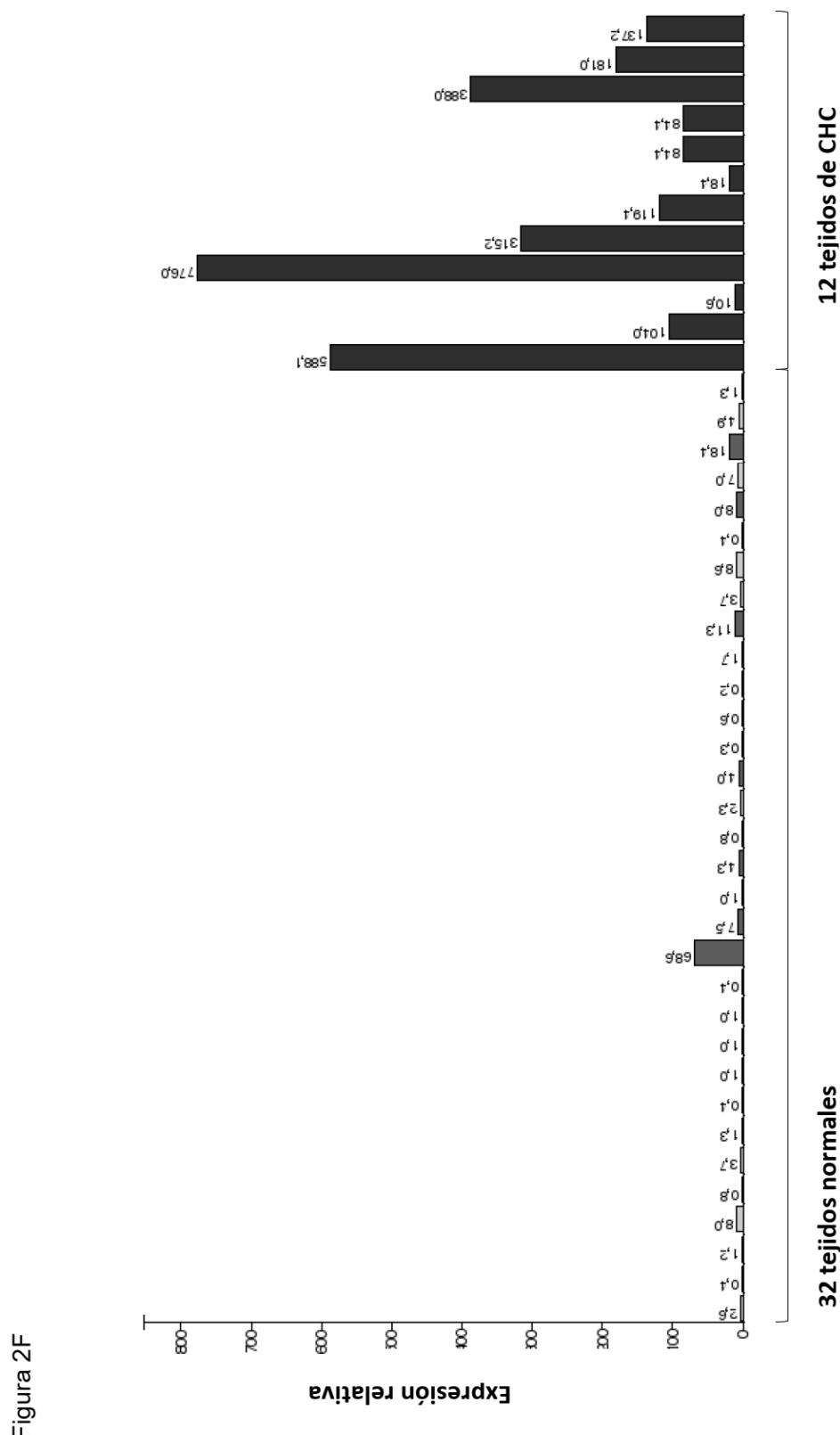


Figura 3

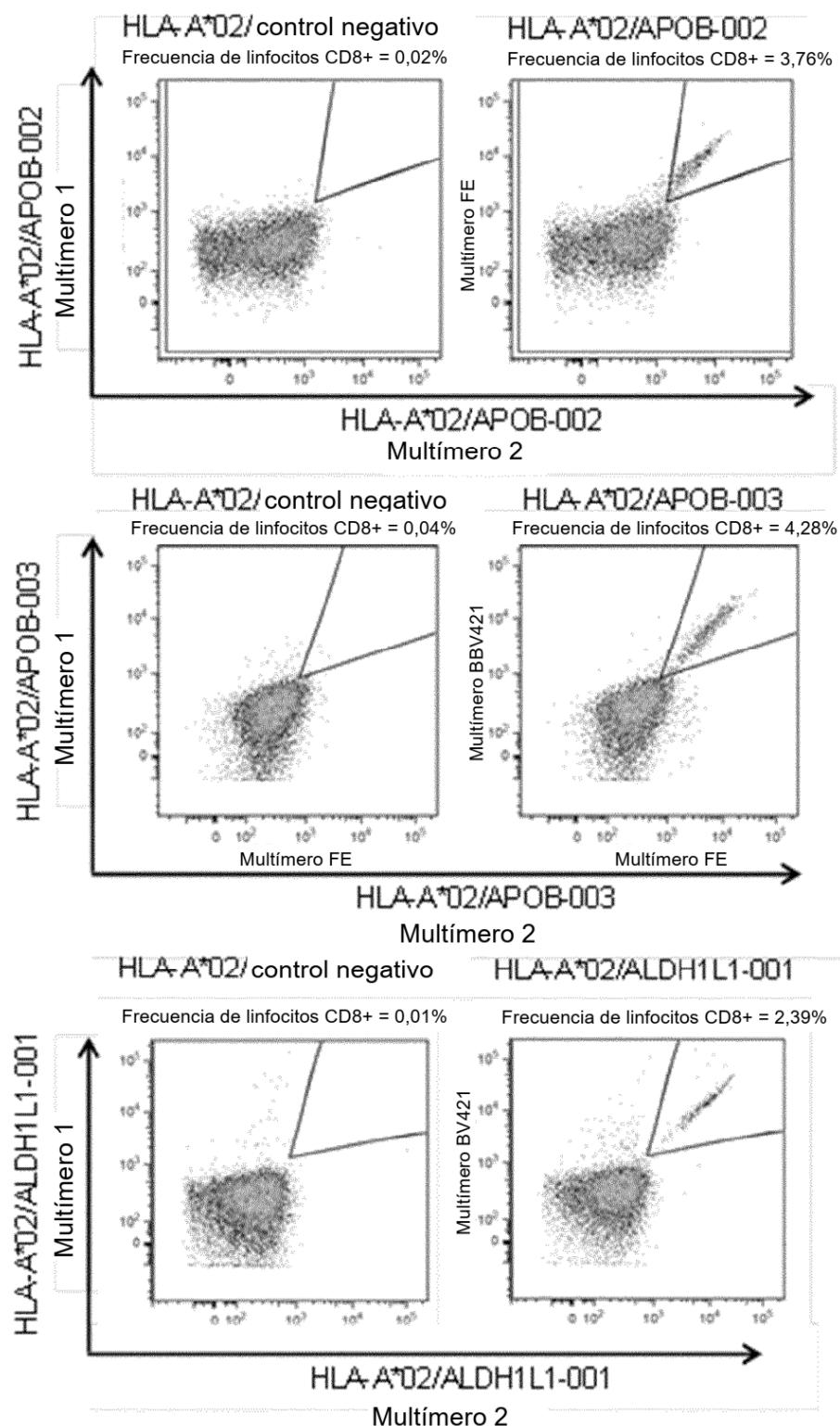
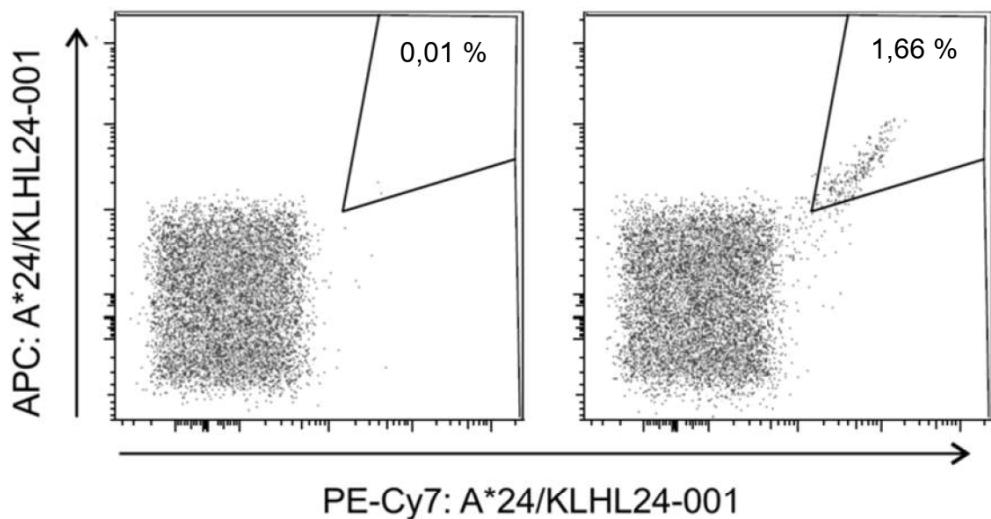


Figura 4

A



B

